



**Emanuel Augusto
Vieira Capela**

**Produção e purificação de anticorpos utilizando
sistemas aquosos bifásicos constituídos por
líquidos iónicos como adjuvantes**

**Production and purification of antibodies using
aqueous biphasic systems composed of ionic liquids
as adjuvants**



**Emanuel Augusto
Vieira Capela**

**Produção e purificação de anticorpos utilizando
sistemas aquosos bifásicos constituídos por
líquidos iónicos como adjuvantes**

**Production and purification of antibodies using
aqueous biphasic systems composed of ionic
liquids as adjuvants**

Tese de Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, Ramo de Métodos Biomoleculares, realizada sob a orientação científica da Doutora Mara Guadalupe Freire Martins, Investigadora Coordenadora no Departamento de Química, CICECO, da Universidade de Aveiro, da Professora Doutora Ana Margarida Nunes da Mata Pires de Azevedo, Investigadora Científica do Departamento de Bioengenharia, Instituto de Bioengenharia e Biociências, do Instituto Superior Técnico da Universidade de Lisboa e da Professora Doutora Maria Raquel Murias dos Santos Aires-Barros, Professora Catedrática do Departamento de Bioengenharia, Instituto de Bioengenharia e Biociências, do Instituto Superior Técnico da Universidade de Lisboa.

"Deus quer, o homem sonha, a obra nasce"

– Fernando Pessoa

o júri

presidente

Prof. Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues

professor auxiliar com agregação do Departamento de Química, QOPNA, da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Ana Cecília Afonso Roque

professora auxiliar com agregação do Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

Doutora Mara Guadalupe Freire Martins

investigadora coordenadora do Departamento de Química, CICECO, da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Este é o momento no qual as palavras escasseiam, e o que quer que se profira parece pouco para agradecer a todas as pessoas que permitiram que isto se tornasse possível. Inicialmente, gostaria de agradecer à minha orientadora, a Doutora Mara Freire, pois nunca terei palavras suficientes para lhe agradecer tudo o que fez por mim ao longo deste período, por ter acreditado em mim e no meu trabalho, por me ter acompanhado sempre de forma tão presente, por me incentivar para o presente e para o futuro, e por me ter permitido trabalhar numa área que me faz tão feliz. Obrigado por ser uma referência para mim e uma das minhas inspirações para o futuro. Gostaria ainda de proferir um enorme agradecimento às minhas co-orientadoras, Doutora Ana Azevedo e Professora Doutora Raquel Aires-Barros, por me terem recebido de forma tão simpática e acolhedora no IST em Lisboa, por me permitirem adquirir novas competências e conhecimentos valiosos no iBB, por toda a paciência para esclarecerem as minhas questões e por me orientarem nas várias etapas por que este projeto atravessou. Neste seguimento, não podia deixar de agradecer a todos os membros do iBB por terem sido a minha segunda família ao longo deste último ano, por terem sido ótimos colegas, amigos e companheiros, e por toda a ajuda disponibilizada, particularmente à Isabel Pinto, Sara Rosa, André Nascimento, Alexandra Wagner, Ana Pfluck, Inês Pinto e Ricardo Fradique. Gostaria também de endereçar um enorme obrigado ao grupo de investigação PATh, que apesar da distância se manteve sempre presente na minha vida, e em especial à Ana Maria pelas preciosas orientações e conselhos de sempre, bem como à Teresa Dinis, Maria João e Pankaj por toda a ajuda que me disponibilizaram. Não poderia deixar de agradecer ao professor Eduardo Melo da Universidade do Algarve por todos os ensinamentos referentes à técnica de DC. Um especial e carinhoso agradecimento à minha mãe, pelo apoio e força incondicionais que me transmitiu nesta fase da minha vida e por estar sempre presente em todas as ocasiões, e ao meu pai por se interessar tanto pelo meu trabalho e por estar sempre ao meu lado, dando preciosas dicas que terei presentes em toda a minha vida, agradeço muito por tudo o que fizeram por mim. Neste sentido, gostaria ainda de agradecer a toda a minha família pelo que representam para mim, e em especial à minha avó Isabel, tia Marita, tia Élia e tio Sá e à minha prima Soraia por toda a ajuda que me prestaram ao longo deste ano e por representarem tanto para mim. Finalmente, não poderia deixar de agradecer o apoio incondicional de várias pessoas importantíssimas na minha vida, aqueles que são a família que nós escolhemos: ao Rafa por ter sido um verdadeiro irmão ao longo deste ano; à Kiki, por seres o meu apoio de sempre e nunca me falhares; à Madalena Araújo, Lisete Moutinho e Mariana Reis, por todos os momentos de diversão e aventura que passamos juntos; à Daniela Santos, Catarina Cruz e Rita Reis, por serem as melhores pessoas que já conheci; à Sara Ferradaz, Luís Melo, Rafaela Oliveira, Luís Silva, Hugo Sá, Teresa Oliveira e Juliana Gaspar, porque esta tese só é possível graças ao vosso apoio incondicional, em cada página existe um bocadinho de cada um de vós, obrigado por serem os melhores amigos do Mundo, e como um dia me disseram: 'alguns acreditam em anjos, nós acreditamos na amizade, e o teu sorriso será sempre o nosso', agradeço do fundo do coração por sorrirem sempre comigo.

palavras-chave

Biofármacos, anticorpos, anticorpos monoclonais, imunoglobulina G, produção, culturas celulares CHO, extração líquido-líquido, purificação, sistemas aquosos bifásicos, líquidos iônicos.

resumo

Atualmente, os anticorpos monoclonais (mAbs) apresentam-se como a classe prevalente de proteínas recombinantes terapêuticas para o tratamento de diversas doenças, incluindo o cancro (ex: cancro da mama, leucemia e cancro da próstata), doenças autoimunes (artrite reumatoide e doença de Crohn), asma e doenças cardiovasculares e infecciosas. Embora o processamento a montante de mAbs, e em particular da imunoglobulina G (IgG), tenha vindo a melhorar consideravelmente ao longo dos últimos anos, o processamento a jusante não tem progredido a esse mesmo ritmo, sendo atualmente considerado a etapa limitante da produção de IgG. A plataforma estabelecida para a sua purificação compreende uma etapa primária de captura do anticorpo através de cromatografia de afinidade com proteína A, seguido de duas etapas cromatográficas subsequentes de purificação. Apesar de este ser o método predileto da indústria, existem limitações atuais decorrentes da utilização de cromatografia, nomeadamente os elevados custos associados ao processo e ainda limitações intrínsecas ao próprio ligando. Neste sentido, os sistemas aquosos bifásicos (SAB) apresentam-se como uma valiosa alternativa não-cromatográfica, permitindo a redução de custos e do número de etapas envolvidas no processo, comparativamente aos métodos convencionais. No entanto, os SAB tradicionais constituídos maioritariamente por sais e/ou polímeros têm-se mostrado pouco seletivos, resultando em baixos rendimentos e fatores de purificação. Por outro lado, os líquidos iônicos (LIs) são uma nova classe de solventes que permitem manipular a polaridade e afinidade das fases coexistentes através de uma escolha adequada da sua estrutura química. Apesar desta possibilidade, a sua aplicação na formação de SAB para a extração e purificação de IgG ainda não foi reportada na literatura. Assim sendo, neste trabalho estudaram-se vários LIs como adjuvantes, em várias concentrações, em SAB convencionais PEG/Fosfato e PEG/Dextrano, para a extração seletiva e posterior purificação de IgG diretamente de sobrenadantes de linhas celulares desenvolvidas a partir de ovário de hamster chinês (CHO). De acordo com os resultados obtidos, é possível constatar que a presença de LIs como adjuvantes permite manipular a polaridade e afinidade das fases coexistentes dos SAB, aumentando o seu potencial de extração para a IgG. Mais ainda, o sistema constituído por PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H₂O + 20% [C₄mim]Br demonstrou-se extremamente promissor para a extração seletiva e posterior purificação de IgG, possibilitando a extração de IgG para a fase rica em PEG com um rendimento de 82% e com um grau de pureza de 64% em apenas uma etapa. Neste contexto, foi assim desenvolvida uma nova plataforma de extração e purificação de IgG diretamente a partir de sobrenadantes de culturas celulares CHO, sendo previsível a sua aplicação a larga escala.

keywords

Biopharmaceuticals, antibodies, monoclonal antibodies, immunoglobulin G, production, CHO cell culture, liquid-liquid extraction, purification, aqueous biphasic systems, ionic liquids.

abstract

Currently, monoclonal antibodies (mAbs) are the most prevalent class of recombinant protein therapeutics for the treatment of several diseases, namely cancer (e.g.: breast cancer, leukemia and prostate cancer), auto-immune disorders (rheumatoid arthritis and Crohn's disease), asthma, and cardiovascular and infectious diseases. Although the upstream processing of mAbs, especially immunoglobulin G (IgG), has improved considerably in the last years, the downstream processing has not evolved at the same pace and is currently considered the bottleneck in the manufacturing of therapeutic IgG. The established platform for IgG purification comprises a capture primary stage of the antibody using protein A affinity chromatography, followed by two subsequent chromatographic purification steps. Although this is the industry golden standard purification platform, there are some problems arising from the use of chromatography, such as the high cost associated to the process and also some intrinsic limitations of the ligand itself. In this context, aqueous biphasic systems (ABS) can be highlighted as a promising non-chromatographic alternative, taking into account their advantages resulting from a reduction of the costs and number of steps involved in the process when compared with conventional methods. However, traditional ABS mainly composed of salts and/or polymers are not selective, resulting in low yields and purification factors. On the other hand, ionic liquids (ILs) are a new class of solvents which allow the manipulation of the polarity and affinity of the coexistent phases by an appropriate choice of the chemical structure of the IL. However, and despite this possibility, their application in the formation of ABS for the extraction and purification of IgG has not yet been reported in the literature. In this context, herein in this work, several ILs were studied as adjuvants in different concentrations, in conventional PEG/Phosphate and PEG/Dextran ABS, for the selective extraction and further purification of IgG directly from Chinese Hamster Ovary (CHO) cell culture supernatants. According to the obtained results, it was demonstrated that the presence of ILs as adjuvants allowed the manipulation and the tailoring of phases' polarities/affinities, increasing ABS extraction potential towards IgG. Moreover, the system composed of PEG 3350 + dextran 500 kDa + H₂O + 20% [C₄mim]Br has lead to extremely promising results concerning the selective extraction and further purification of IgG, achieving extraction yields of 82% for the PEG-rich phase with a purity level of 64% in a single-step. In this context, novel ABS composed of IL as adjuvant is proposed as an effective platform for the extraction/purification of value-added IgG directly from CHO cell cultures supernatants, and their application at a large scale is thus envisaged.

Índice

1. Introdução	1
1.1. Âmbito da investigação	1
1.2. Mercado biofarmacêutico	3
1.3. Anticorpos.....	5
1.4. Imunoglobulina G (IgG).....	10
1.5. Processamento a montante de mAbs	13
1.5.1. Tecnologia Hibridoma	14
1.5.2. Tecnologia de ADN recombinante	16
1.5.3. Meios de cultura	19
1.6. Processamento a jusante de mAbs	22
1.6.1. Plataformas estabelecidas.....	23
1.6.2. Processos alternativos	26
1.7. Sistemas Aquosos Bifásicos (SAB)	30
1.7.1. Líquidos Iônicos (LIs) como constituintes de SAB	38
1.8. Motivação e objetivo da dissertação	40
2. Materiais e Métodos.....	42
2.1. Produção de anticorpos monoclonais anti-IL-8	42
2.1.1. Linha celular e meio de cultura	42
2.1.2. Passagem celular.....	42
2.2. Sistemas quaternários PEG + Fosfato + H ₂ O + LI.....	44
2.2.1. Reagentes químicos	44
2.2.2. Reagentes biológicos	44
2.2.3. Procedimento experimental para a extração de IgG comercial	45
2.2.3.1. Preparação dos SAB	45
2.2.3.2. Determinação do pH das fases	46
2.2.3.3. Quantificação de IgG	46
2.2.3.4. Determinação dos coeficientes de partição e rendimentos/eficiências de extração da IgG.....	46
2.3. Sistemas quaternários PEG + Dextrano + H ₂ O + LI.....	47
2.3.1. Reagentes químicos	47
2.3.2. Reagentes biológicos	49
2.3.3. Procedimento experimental para a caracterização do sistema	50

2.3.3.1. Determinação do diagrama de fase	50
2.3.4. Procedimento experimental para a extração de IgG comercial	51
2.3.4.1. Preparação dos SAB	51
2.3.4.2. Determinação dos coeficientes de partição e rendimentos/eficiências de extração da IgG.....	52
2.3.4.3. Determinação dos coeficientes de partição e eficiências de extração dos LIs ..	53
2.3.5. Procedimento experimental para a extração de IgG anti-IL-8 a partir de sobrenadantes de culturas celulares CHO	54
2.3.5.1. Preparação dos SAB	54
2.3.5.2. Determinação dos coeficientes de partição e rendimentos/eficiências de extração da IgG.....	55
2.3.5.3. Determinação do nível de pureza da IgG.....	56
2.3.6. Avaliação da integridade/estabilidade da IgG após a etapa de extração	57
2.3.6.1. Avaliação do perfil proteico	57
2.3.6.2. Determinação do ponto isoelétrico (pI) das proteínas	58
2.3.6.3. Avaliação da estabilidade da estrutura secundária da IgG.....	59
2.3.6.4. Avaliação da estabilidade da estrutura terciária da IgG.....	60
3. Resultados e Discussão.....	61
3.1. Produção de anticorpos monoclonais anti-IL-8	61
3.2. Caracterização dos <i>stocks</i> de IgG.....	67
3.3. Sistemas quaternários PEG + Fosfato + H ₂ O + LI.....	71
3.4. Sistemas quaternários PEG + Dextrano + H ₂ O + LI.....	77
3.4.1. Caracterização do sistema em estudo	77
3.4.2. Extração de IgG pura/comercial	80
3.4.2.1. Efeito do catião do LI	83
3.4.2.2. Efeito do ânion do LI	85
3.4.2.3. Efeito da concentração do LI.....	87
3.5. Extração de IgG anti-IL-8 a partir de sobrenadantes de culturas celulares CHO ..	96
3.6. Avaliação da integridade/estabilidade da IgG	102
3.7. Conclusões	115
3.8. Trabalho futuro	117
4. Referências	118
5. Anexos	133

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Vendas globais combinadas das 50 principais companhias farmacêuticas (excluindo as companhias de medicamentos genéricos) por tipo de molécula, no período compreendido entre 2010 e 2015 [26].	4
Tabela 2 – Propriedades principais das sub-classes de IgG humana. Adaptado de Nikolayenko <i>et al.</i> [47].	11
Tabela 3 – Métodos cromatográficos e não-cromatográficos para a purificação de IgG, comparados em termos de rendimento de extração e de pureza.....	27
Tabela 4 – SAB investigados por Aires-Barros e colaboradores [23, 135, 147-160] para a extração e purificação de IgG, comparados em termos de rendimento de extração e de pureza.	34
Tabela 5 – Pontos de mistura estudados com vista à extração de IgG com o sistema ternário controlo PEG 3350 + fosfato + H ₂ O e com os sistemas quaternários PEG 3350 + fosfato + H ₂ O + LI.....	72
Tabela 6 – Parâmetros de correlação utilizados para descrever os dados experimentais da curva binodal pela Equação de Merchuk.	79
Tabela 7 – Dados experimentais das TLs e TLLs para o sistema PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H ₂ O.	79
Tabela 8 – Pontos de mistura estudados com vista à extração de IgG com o sistema ternário controlo PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H ₂ O e com os sistemas quaternários PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H ₂ O + LI.	81
Tabela 9 – Pontos de mistura estudados com vista à extração de IgG com o sistema ternário controlo PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H ₂ O e com os sistemas quaternários PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H ₂ O + LI.	93
Tabela 10 – Condições testadas para a extração seletiva e purificação de IgG anti-IL-8 diretamente a partir de sobrenadantes de culturas celulares CHO DP-12 com o sistema ternário controlo PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H ₂ O e com os sistemas quaternários PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H ₂ O + LI.	97

Anexo A

Tabela A. 1 – Anticorpos monoclonais terapêuticos aprovados ou em revisão pela US Food and Drug Administration em Junho de 2015.....	133
---	-----

Anexo E

Tabela E. 1 – Dados experimentais das frações mássicas para o sistema constituído por PEG 3350 (1) + dextrano 500 kDa (2) + H ₂ O (3) a 25 °C (± 1 °C), à pressão atmosférica e ao pH do sistema.	139
--	-----

Lista de Figuras

- Figura 1** – (A) Representação esquemática de um anticorpo. Proteína com uma forma em “Y”, composta por duas cadeias leves (representadas a vermelho) e duas cadeias pesadas (representadas a azul). As cadeias pesadas apresentam três secções contantes (azul claro) e uma região variável (azul escuro). As cadeias leves apresentam uma região constante (rosa claro) e uma região variável (rosa escuro). A parte inferior do anticorpo é designada região Fc, à qual se encontram associados dois braços, as regiões Fab. As cadeias leves e pesadas associam-se por ligações de dissulfureto. Os domínios variáveis apresentam regiões determinantes de complementaridade (CDRs) que ligam diretamente ao antígeno. (B) Representação tridimensional de um anticorpo convencional. As cadeias pesadas encontram-se representadas a verde e a azul, enquanto que as cadeias leves da molécula se encontram representadas a laranja e rosa. Adaptado de Moran *et al* [32]. ... 6
- Figura 2** – Estrutura geral das quatro sub-classes de IgG humana, que diferem entre si no número e disposição das ligações de dissulfureto intercadeia (linhas pretas) que ligam as cadeias pesadas. Adaptado de Owen *et al.* [43]. 10
- Figura 3** – Imunidade ativa vs. imunidade passiva. Adaptado de Abbas *et al.* [33]..... 12
- Figura 4** – Humanização de anticorpos através de engenharia genética. Os mAbs podem ter origem em murino (100% proteína de rato) [sufixo: -omab], quiméricos (compostos por aproximadamente 35% de sequências de rato) [sufixo: -ximab], humanizados (possuem apenas 5-10% de regiões de rato) [sufixo: -zumab] ou totalmente humanos (100% proteína humana) [sufixo: -umab]. Adaptado de Carter *et al.* [61]. 15
- Figura 5** – Plataforma típica de processamento a jusante de mAbs. Os sobrenadantes das culturas celulares resultantes do processo a montante são habitualmente purificados através de um processo de captura por cromatografia proA. De modo a remover todos os contaminantes após esta etapa de captura, e de forma a obter uma pureza final em conformidade com as agências reguladoras, são aplicadas duas etapas adicionais de purificação. Adaptado de Rosa *et al.* [2]. 24
- Figura 6** – Representação esquemática de um processo de purificação por cromatografia de afinidade com proA. A proA encontra-se imobilizada na coluna, e após o carregamento da coluna com a amostra, os mAbs são retidos através da ligação por afinidade à proA. Seguidamente, é aplicada uma lavagem à coluna para remover as ligações não específicas,

seguindo-se a eluição dos mAbs e regeneração da coluna para posterior utilização. Adaptado de Roque <i>et al.</i> [106].	25
Figura 7 – Representação esquemática de um diagrama de fases hipotético de um sistema constituído por 2 polímeros. A curva binodal encontra-se representada pelos pontos A-B-C-D, e delimita a região monofásica da região bifásica. Os pontos B-M-D representam uma <i>tie-line</i> , que para um qualquer ponto de mistura ao longo desta, a composição exata das fases superior e inferior do SAB serão sempre D e B, respetivamente. A razão volumétrica das duas fases coexistentes encontra-se representado graficamente junto de cada ponto da <i>tie-line</i> . Adaptado de Freire <i>et al.</i> [133].	32
Figura 8 – Estruturas químicas dos LIs estudados como adjuvantes no sistemas PEG+Fosfato+H ₂ O: (i) [N ₁₁₁₁]Cl; (ii) [C ₄ mim]Cl.	44
Figura 9 – Estruturas químicas dos LIs estudados como adjuvantes nos sistemas PEG+Dextrano+H ₂ O: (i) [N ₁₁₁₁]Cl; (ii) [N ₄₄₄₄]Cl; (iii) [P ₄₄₄₄]Cl; (iv) [C ₄ -4mpy]Cl; (v) [Ch]Cl; (vi) [Ch][Ac]; (vii) [C ₄ mim]Cl; (viii) [C ₄ mim]Br; (ix) [C ₄ mim][HSO ₄].	48
Figura 10 – Evolução da morfologia das células CHO DP-12 ao longo dos 4 dias de cultura num meio 25% DMEM/ 75% ProCHO TM 5: (A) e (B) – dia 0 (após a passagem celular), ampliada 100x e 400x respetivamente; (C) e (D) – dia 1, ampliada 100x e 400x respetivamente; (E) e (F) – dia 2, ampliada 100x e 200x respetivamente; (G) e (H) – dia 3, ampliada 100x e 200x respetivamente; (I) e (J) – dia 4, ampliada 100x e 400x respetivamente.	62
Figura 11 – Proliferação das células CHO DP-12 num meio 25% DMEM/ 75% ProCHO TM 5, avaliada em termos da sua densidade e viabilidade celular durante a expansão da cultura celular em frascos T ao longo de 6 passagens.	64
Figura 12 – Proliferação das células CHO DP-12 num meio 25% DMEM/ 75% ProCHO TM 5, avaliada em termos da sua produtividade e pH do meio durante a expansão da cultura celular em frascos T ao longo de 6 passagens.	65
Figura 13 – Produção de anticorpos monoclonais IgG anti-IL-8, por células CHO DP-12 num meio 25% DMEM/ 75% ProCHO TM 5, expressa em concentração de anticorpo produzido (mg/L) durante a expansão da cultura celular em frascos T ao longo de 6 passagens.	66
Figura 14 – SDS-PAGE de um gel 12% T e 3% C, corado com azul de Coomassie, carregado com as seguintes amostras: Poço 1 – marcador de peso molecular; Poço 2 – IgG pura Gammanorm 1 g/L; Poço 3 – sobrenadante proveniente de uma cultura celular	

CHO DP-12. A posição das cadeias pesadas (50 kDa) e das cadeias leves (25 kDa) da IgG encontram-se destacadas e indicadas na região à direita do gel.	68
Figura 15 – Gel de focagem isoeletrica (IEF) 5% T e 3% C, corado com nitrato de prata e carregado com as seguintes amostras: Poço 1 – marcador de pontos isoeletricos; Poço 2 – IgG pura Gammanorm; Poço 3 – sobrenadante proveniente de uma cultura celular CHO DP-12.	70
Figura 16 – Aspetto macroscópico dos sistemas PEG + fosfato + H ₂ O, com diferentes concentrações de LI como adjuvante, que permitiram a formação de SAB apropriados à partição da IgG. A razão volumétrica das fases coexistentes (fase inferior – FI; fase superior – FS) encontra-se indicada na barra azul, e a interface do sistema encontra-se realçada com um círculo descontínuo vermelho.	73
Figura 17 – Rendimentos de extração e eficiências de extração da IgG nos SAB quaternários PEG + fosfato + H ₂ O + LIs em estudo, e respectivos valores de pH na fase superior (FS) e na fase inferior (FI). * significa que o rendimento e eficiência de extração de IgG para a FS é negligenciável, e portanto, impossível de ser determinada experimentalmente.	74
Figura 18 – Coeficientes de partição da IgG nos SAB quaternários PEG + fosfato + H ₂ O + LIs em estudo, e respectivos valores de pH na fase superior (FS) e na fase inferior (FI). * significa que a quantidade de IgG que particiona para a FS é negligenciável, e portanto, impossível de ser determinada experimentalmente.	74
Figura 19 – Diagrama de fases do sistema ternário constituído por PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H ₂ O, a 25 °C (± 1 °C), à pressão atmosférica e ao pH do sistema: curva binodal (♦); TLs (▲); ajuste da curva binodal pela Equação 7 (-).	79
Figura 20 – Aspetto macroscópico dos sistemas PEG + dextrano + H ₂ O, com diferentes concentrações de LI como adjuvante, que permitiram a formação de SAB apropriados à partição da IgG. A razão volumétrica das fases coexistentes (fase inferior – FI; fase superior – FS) encontra-se indicada na barra azul, e a interface do sistema encontra-se realçada com um círculo descontínuo vermelho.	82
Figura 21 – Rendimentos de extração da IgG (% Y _{IgG}) nos SAB quaternários formados por PEG + dextrano + H ₂ O + 1% de diferentes LIs derivados do anião cloreto.	83
Figura 22 – Coeficientes de partição da IgG (K _{IgG}) nos SAB quaternários formados por PEG + dextrano + H ₂ O + 1% de diferentes LIs derivados do anião cloreto.	84

Figura 23 – Rendimentos de extração da IgG (% Y_{IgG}) nos SAB quaternários formados por PEG + dextrano + H_2O + 1% de diferentes LIs derivados dos cátions $[Ch]^+$ e $[C_4mim]^+$	85
Figura 24 – Coeficientes de partição da IgG (K_{IgG}) nos SAB quaternários formados por PEG + dextrano + H_2O + 1% de diferentes LIs derivados dos cátions $[Ch]^+$ e $[C_4mim]^+$	85
Figura 25 – Rendimentos de extração da IgG (% Y_{IgG}) nos SAB quaternários formados por PEG + dextrano + H_2O + 1, 5 e 10% dos LIs $[N_{4444}]Cl$, $[P_{4444}]Cl$, $[C_4-4mpy]Cl$, $[Ch][Ac]$ e $[C_4mim][HSO_4]$. Os valores de pH na fase superior (FS) e na fase inferior (FI) dos sistemas encontram-se igualmente representados no gráfico.....	87
Figura 26 – Coeficientes de partição da IgG (K_{IgG}) nos SAB quaternários formados por PEG + dextrano + H_2O + 1, 5 e 10% dos LIs $[N_{4444}]Cl$, $[P_{4444}]Cl$, $[C_4-4mpy]Cl$, $[Ch][Ac]$ e $[C_4mim][HSO_4]$	88
Figura 27 – Rendimentos de extração da IgG (% Y_{IgG}) nos SAB quaternários formados por PEG + dextrano + H_2O + 1, 5 e 10% dos LIs $[Ch]Cl$, $[N_{1111}]Cl$, $[C_4mim]Cl$ e $[C_4mim]Br$. A eficiência de extração de cada LI para a fase superior rica em PEG dos sistemas encontra-se igualmente representada no gráfico.....	91
Figura 28 – Coeficientes de partição da IgG (% Y_{IgG}) nos SAB quaternários formados por PEG + dextrano + H_2O + 1, 5 e 10% dos LIs $[Ch]Cl$, $[N_{1111}]Cl$, $[C_4mim]Cl$ e $[C_4mim]Br$	91
Figura 29 – Aspeto macroscópico dos sistemas PEG + dextrano + H_2O , com diferentes concentrações de $[C_4mim]Br$ como adjuvante, que permitiram a formação de SAB apropriados à partição da IgG. A razão volumétrica das fases coexistentes (fase inferior – FI; fase superior – FS) encontra-se indicada na barra azul, e a interface do sistema encontra-se realçada com um círculo descontínuo vermelho.....	94
Figura 30 – Rendimentos de extração da IgG (% Y_{IgG}) nos SAB quaternários formados por PEG + dextrano + H_2O + 1, 5, 10, 15, 20 e 35% de $[C_4mim]Br$. A eficiência de extração do LI para a fase superior rica em PEG dos sistemas encontra-se igualmente representada no gráfico.	95
Figura 31 – Aspeto macroscópico dos sistemas PEG + dextrano + H_2O , com diferentes concentrações de $[Ch][Ac]$ e $[C_4mim]Br$ como adjuvantes, que permitiram a formação de SAB apropriados à partição da IgG e das impurezas proteicas presentes nos sobrenadantes das culturas celulares CHO DP-12. A razão volumétrica das fases coexistentes (fase	

inferior – FI; fase superior – FS) encontra-se indicada na barra azul, e a interface do sistema encontra-se realçada com um círculo descontínuo vermelho.	98
Figura 32 – Rendimentos de extração (% Y_{IgG}) e níveis de pureza (% Pureza $_{IgG}$) da IgG extraída a partir de sobrenadantes de culturas celulares CHO DP-12 através de SAB quaternários formados por PEG + dextrano + H ₂ O e com diferentes concentrações de LI como adjuvante (1, 5 e 10% de [Ch][Ac] + 10, 15 e 20% de [C ₄ mim]Br). Os valores de pH na fase superior (FS) e na fase inferior (FI) dos sistemas encontram-se igualmente representados no gráfico.....	99
Figura 33 – Coeficientes de partição da IgG (% Y_{IgG}) extraída a partir de sobrenadantes de culturas celulares CHO DP-12 através de SAB quaternários formados por PEG + dextrano + H ₂ O e com diferentes concentrações de LI como adjuvante (1, 5 e 10% de [Ch][Ac] + 10, 15 e 20% de [C ₄ mim]Br).....	99
Figura 34 – SDS-PAGE de um gel 12% T e 3% C, corado com azul de Coomassie, carregado com as seguintes amostras: Poço 1 – marcador de peso molecular; Poço 2 – IgG pura Gammanorm; Poço 3 – sobrenadante proveniente de uma cultura celular CHO DP-12; Restantes poços – fase superior (FS) e fase inferior (FI) das extrações de IgG anti-IL-8 diretamente a partir de sobrenadantes de culturas celulares CHO DP-12, através de SAB constituídos por PEG + dextrano + H ₂ O e com diferentes concentrações de LI como adjuvante (1, 5 e 10% de [Ch][Ac] + 10, 15 e 20% de [C ₄ mim]Br). A posição das cadeias pesadas (50 kDa) e das cadeias leves (25 kDa) da IgG encontram-se destacadas e indicadas no próprio gel.	103
Figura 35 – Gel de focagem isoeletrica (IEF) 5% T e 3% C, corado com nitrato de prata e carregado com as seguintes amostras: Poço 1 – marcador de pontos isoeletricos; Poço 2 – IgG pura Gammanorm 1 g/L; Poço 3 – sobrenadante proveniente de uma cultura celular CHO DP-12; Restantes poços – fase superior (FS) e fase inferior (FI) das extrações de IgG anti-IL-8 diretamente a partir de sobrenadantes de culturas celulares CHO DP-12, através de SAB constituídos por PEG + dextrano + H ₂ O e com diferentes concentrações de LI como adjuvante (10% de [Ch][Ac] + 15 e 20% de [C ₄ mim]Br). A posição da banda referente ao pI da IgG encontra-se destacada a verde e indicada no próprio gel.	105
Figura 36 – Espectros de DC na região do <i>Far-UV</i> (198 – 250 nm) da IgG na sua forma nativa (em PBS) e na fase rica em PEG após a sua extração utilizando SAB constituídos por PEG + dextrano + H ₂ O e com diferentes concentrações de [Ch][Ac] como adjuvante.	108

Figura 37 – Espectros de emissão de fluorescência na região compreendida entre 300 – 500 nm da IgG na sua forma nativa (em PBS) e na fase rica em PEG após a sua extração utilizando SAB constituídos por PEG + dextrano + H₂O e com diferentes concentrações de [Ch][Ac] como adjuvante: (A) Espectro de emissão de fluorescência normalizado de acordo com o comprimento de onda máximo; (B) Espectro de emissão de fluorescência não normalizado..... 110

Figura 38 – Espectros de DC na região do *Far-UV* (198 – 250 nm) da IgG na sua forma nativa (em PBS) e na fase rica em PEG após a sua extração utilizando SAB constituídos por PEG + dextrano + H₂O e com diferentes concentrações de [P₄₄₄]Cl como adjuvante. 112

Figura 39 – Espectros de emissão de fluorescência na região compreendida entre 300 – 500 nm da IgG na sua forma nativa (em PBS) e na fase rica em PEG após a sua extração utilizando SAB constituídos por PEG + dextrano + H₂O e com diferentes concentrações de [Ch][Ac] como adjuvante: (A) Espectro de emissão de fluorescência normalizado de acordo com o comprimento de onda máximo; (B) Espectro de emissão de fluorescência não normalizado..... 113

Anexo B

Figura B. 1 – Exemplo de uma curva de calibração tipicamente utilizada para a quantificação de IgG por cromatografia de afinidade com Proteína G, obtida através de soluções stock de IgG Gammanorm com concentrações compreendidas entre 0,2 mg/L e 20 mg/L. 136

Anexo C

Figura C. 1 – Exemplo de uma curva de calibração tipicamente utilizada para a quantificação de LIs por quantificação do anião Cl⁻ através de elétron seletivo de cloretos, obtida através de uma solução stock de KCl com concentrações compreendidas entre 0,1 mmol/L e 100 mmol/L. 137

Anexo D

Figura D. 1 – Exemplo de uma curva de calibração tipicamente utilizada para a quantificação das proteínas totais pelo método de Bradford, obtida com a BSA como padrão e com concentrações compreendidas entre 5 mg/L e 400 mg/L. 138

Lista de Símbolos

K_{IgG}	Coeficiente de partição da IgG (adimensional);
$K_{\text{impurezas}}$	Coeficiente de partição das impurezas proteicas (adimensional);
K_{LI}	Coeficiente de partição do líquido iónico (adimensional);
MM	Massa molecular (g/mol)
R^2	Coeficiente de correlação (adimensional);
V_{dextrano}	Volume da fase aquosa rica em dextrano (mL);
V_{fosfato}	Volume da fase aquosa rica em fosfato (mL);
V_{inicial}	Volume da solução <i>stock</i> adicionada ao sistema (mL);
V_{PEG}	Volume da fase aquosa rica em PEG (mL);
β	Basicidade de ligação de hidrogénio (adimensional);
σ	Desvio-padrão;
$\%EE_{\text{IgG}}$	Eficiência de extração da IgG (%);
$\% \text{ (m/m)}$	Percentagem mássica (%);
$\% \text{Pureza}_{\text{IgG}}$	Nível de pureza (%);
$\% \text{viabilidade}$	Percentagem de viabilidade das células (%);
$\%Y_{\text{IgG}}$	Rendimento de extração de IgG (%);
$[\text{impurezas}]_{\text{dextrano}}$	Concentração das impurezas proteicas na fase rica em dextrano (mg/L);
$[\text{impurezas}]_{\text{PEG}}$	Concentração das impurezas proteicas na fase rica em PEG (mg/L);
$[\text{dextrano}]$	Concentração de dextrano (% (m/m));
$[\text{dextrano}]_{\text{dextrano}}$	Concentração de dextrano na fase rica em dextrano (% (m/m));
$[\text{dextrano}]_{\text{M}}$	Concentração de dextrano na mistura inicial (% (m/m));
$[\text{dextrano}]_{\text{PEG}}$	Concentração de dextrano na fase rica em PEG (% (m/m));
$[\text{IgG}]$	Concentração de IgG (% (m/m) ou mg/L);
$[\text{IgG}]_{\text{dextrano}}$	Concentração de IgG na fase aquosa rica em dextrano (% (m/m) ou mg/L);
$[\text{IgG}]_{\text{fosfato}}$	Concentração de IgG na fase aquosa rica em fosfato (% (m/m) ou mg/L);

[IgG]_{inicial}	Concentração de IgG adicionada a partir do <i>stock</i> (% (m/m) ou mg/L);
[IgG]_{PEG}	Concentração de IgG na fase aquosa rica em PEG (% (m/m) ou mg/L);
[LI]_{dextrano}	Concentração de LI na fase aquosa rica em dextrano (% (m/m));
[LI]_{PEG}	Concentração de LI na fase aquosa rica em PEG (% (m/m));
[PEG]	Concentração de PEG (% (m/m));
[PEG]_{dextrano}	Concentração de PEG na fase rica em dextrano (% (m/m));
[PEG]_M	Concentração de PEG na mistura inicial (% (m/m));
[PEG]_{PEG}	Concentração de PEG na fase rica em PEG (% (m/m));
[Proteínas]	Concentração de proteínas totais (mg/L).

Lista de Abreviaturas

AADs	Anticorpos anti-drogas;
ADCC	Citotoxicidade celular dependente de anticorpos;
ADN	Ácido desoxirribonucleíco;
AG	Ácido diglutárico;
Anti-IL-8	Anticorpos monoclonais anti-inteuleucina-8 humana;
APS	Persulfato de amónio;
ATCC	<i>American Tissue Cell Collection</i> ;
BME	Meio basal de Eagle;
BSA	Albumina de soro bovino;
C	Regiões constantes dos anticorpos;
CDC	Citotoxicidade dependente do complemento;
CDRs	Regiões determinantes de complementaridade;
CEM	Cromatografia de exclusão molecular;
CHO	Linha celular desenvolvida a partir de ovário de hamster chinês;
CIH	Cromatografia de interação hidrofóbica;
CTA	Cromatografia de troca aniónica;
CTC	Cromatografia de troca cationica;
DC	Dicroísmo circular;
DHFR	Di-hidrofolato redutase;
DMEM	Meio de Eagle Modificado por Dulbecco;
DTT	DL-ditiotreitol;
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> ;
ELISA	Ensaio imunossorvente ligado a enzimas;
Fab	Fragmento de ligação ao antigénio dos anticorpos;
FBS	Soro bovino fetal;
Fc	Fragmento cristalizável dos anticorpos;
FD	Fator de diluição;
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> ;
FI	Fase inferior do Sistema aquoso bifásico;
FP	Fator de purificação;
FS	Fase superior do sistema aquoso bifásico;

FTIR	<i>Fourier Transform Infrared Radiation;</i>
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase;
GS	Glutamina sintase;
HAT	Meio de seleção contendo hipoxantina, aminopterina e timidina;
HCP	Proteínas da célula hospedeira;
HIB	Células de hibridoma;
HPS	Hidroxipropil amido;
HRP	Peroxidase de rábano;
IEF	Focagem Isoelétrica;
Ig	Imunoglobulina;
IgG	Imunoglobulina G;
IVIG	Terapia de IgG intravenoso;
LI	Líquido iônico;
MA	Mistura artificial;
mAbs	Anticorpos monoclonais;
MEM	Meio mínimo essencial;
NK	Células exterminadoras naturais;
pAbs	Anticorpos policlonais;
PBS	<i>Phosphate buffer saline;</i>
PEG	Polietileno glicol;
Phe	Fenilalanina;
pI	Ponto isoelétrico;
proA	Proteína A;
PVDF	Polivinilidino;
RMN	Ressonância Magnética Nuclear;
RPMI	Meio do <i>Roswell Park Memorial Institute</i> ;
SAB	Sistema aquoso bifásico;
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida;
TEG-AG	Trietileno glicol-ácido diglutárico;
TEMED	N,N,N',N'tetrametiletilenodiamina;
TL	<i>Tie-line</i> ;
TLL	Comprimento da <i>tie-line</i> ;
Trp	Triptofano;

Tyr	Tirosina;
UCON	Óxido de etileno/óxido de propileno;
V	Regiões variáveis dos anticorpos;
[Ch][Ac]	Acetato de colina;
[Ch]Cl	Cloreto de colina;
[C₄mim]Br	Brometo de 1-butil-3-metilimidazólio;
[C₄mim]Cl	Cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio;
[C₄mim][HSO₄]	Hidrogenosulfato de 1-butil-3-metilimidazólio;
[C₄-4mpy]Cl	Cloreto de 1-butil-4-metilpiridínio;
[N₁₁₁₁]Cl	Cloreto de tetrametilamónio;
[N₄₄₄₄]Cl	Cloreto de tetrabutilamónio;
[P₄₄₄₄]Cl	Cloreto de tetrabutilfosfónio.

1. Introdução

1.1. Âmbito da investigação

Nos últimos anos, têm vindo a emergir microrganismos multirresistentes que apresentam mecanismos de resistência aos antibióticos e a terapias convencionais, doenças que não respondem a terapias convencionais, assim como indivíduos cujo sistema imune é insensível à vacinação comum. Estes acontecimentos têm fomentado o desenvolvimento de terapias, alternativas, entre as quais constam os biofármacos, e em particular os anticorpos [1]. Os biofármacos têm melhorado consideravelmente o tratamento de várias doenças, e por vezes apresentam-se como a única terapia aprovada e disponível para as mesmas [2]. Por definição, os biofármacos são produtos de origem biológica, de elevado peso molecular, com uma composição molecular difícil de definir uma vez que são provenientes de misturas heterogéneas a partir de organismos vivos, células, animais ou plantas [3, 4]. Estes podem então tratar-se de proteínas recombinantes, anticorpos ou até mesmo ácidos nucleicos ou produtos derivados destes. Assim sendo, estes produtos de base biológica possuem várias aplicações em áreas de interesse para a medicina, nomeadamente na imunização, e no tratamento de doenças oncológicas, autoimunes, cardiovasculares, inflamatórias e neurológicas [2]. Contudo, apesar de em muitos casos os biofármacos serem a única terapia disponível, o custo de produção de anticorpos de elevada qualidade/grau de pureza para aplicação em imunoterapia passiva continua bastante elevado devido à inexistência de um método de purificação eficaz e economicamente viável, o que tem condicionado portanto a sua aplicação em larga escala e como terapia recorrente [5].

Os anticorpos monoclonais (mAbs) apresentam-se como a classe prevalente de proteínas recombinantes terapêuticas utilizadas para o tratamento de diversas doenças, nomeadamente o cancro (como por exemplo o cancro da mama, leucemia e cancro da próstata), doenças autoimunes (artrite reumatoide e doença de Crohn), asma e doenças cardiovasculares e infecciosas [6]. No que concerne à produção de mAbs terapêuticos, um dos aspetos mais desafiantes no âmbito do mercado biofarmacêutico é o facto de serem requeridas doses terapêuticas bastante elevadas, culminando numa crescente necessidade de se obterem elevadas quantidades de mAbs puros [7]. Os anticorpos são um produto biológico que pode ser produzido a partir de linhas celulares e extraído do seu

sobrenadante extracelular, sem qualquer processo de purificação prévio, exibindo consequentemente um elevado conteúdo de impurezas. Assim, atualmente a produção de anticorpos terapêuticos compreende duas etapas principais: o processamento a montante (*upstream*), que consiste na produção de anticorpos por linhas celulares obtidas a partir de células mamíferas; e o processamento a jusante (*downstream*), que consiste na recuperação, purificação e isolamento dos anticorpos da *debris* celular, meio de processamento e biomoléculas contaminantes [15]. De facto, o processamento a montante dos mAbs tem melhorado consideravelmente nos últimos anos. Por sua vez, o processamento a jusante não tem progredido a esse mesmo ritmo, sendo atualmente considerado a etapa limitante da produção de mAbs [8, 9]. Uma vez que se pretende que estes anticorpos sejam obtidos com um grau de pureza excecional a partir da matriz complexa que é o sobrenadante, o processo a jusante consiste no passo crítico de todo o processo [10].

Atualmente, a purificação de mAbs é efetuada através de uma plataforma de extração que engloba três etapas cromatográficas, compreendendo uma etapa primária de captura do anticorpo através de cromatografia de afinidade com proteína A (cromatografia proA), seguido de duas etapas subsequentes de purificação de modo a remover as proteínas celulares remanescentes, ADN, proteína A que tenha sofrido lixiviação da coluna de afinidade, agregados, e ainda providenciar um nível adequado de remoção viral [11, 12]. A cromatografia proA baseia-se na interação altamente específica entre a região Fc dos mAbs e a proteína A imobilizada, a qual é um componente da parede celular de uma bactéria designada *Staphylococcus aureus*, e que permite obter purezas superiores a 99% num único passo [13]. Embora este seja o método predileto pela indústria para obter elevadas eficiências de extração e elevada seletividade, existem algumas limitações decorrentes da utilização da cromatografia, nomeadamente os elevados custos associados ao processo – os quais podem ser até 10 vezes superiores comparativamente com os suportes cromatográficos convencionais [8] – e ainda limitações intrínsecas do próprio ligando. Estas limitações incluem: i) a possível lixiviação do próprio ligando e a sua co-eluição juntamente com o anticorpo-alvo, ii) a baixa estabilidade face às severas condições de higienização requeridas, e ainda iii) as consequências na integridade do anticorpo ocorridas na fase de eluição, uma vez que a eluição é efetuada em condições acídicas que podem causar a inativação e/ou agregação do anticorpo [10]. É assim evidente, a necessidade de desenvolver um método de processamento a jusante capaz de originar melhores rendimentos e de efetuar a purificação numa operação unitária, e que

apresente a capacidade de lidar com elevadas densidades celulares, contrariamente ao que acontece com as tecnologias sólido-líquido tradicionais (centrifugação e filtração).

A demanda por protocolos alternativos de purificação não-cromatográfica, que permitam colmatar as limitações impostas pela cromatografia proA, tem sido um tópico de elevado interesse nos últimos anos. Nesse sentido, os sistemas aquosos bifásicos (SAB) podem constituir uma potencial e valiosa alternativa. De facto, recentemente têm sido apresentados vários trabalhos de investigação no desenvolvimento de técnicas alternativas de extração, concentração e purificação de produtos de valor acrescentado das mais diversas matrizes, tais como antioxidantes [14], proteínas [15], enzimas [16] e hormonas [17], recorrendo à técnica de extração líquido-líquido por SAB. Estes permitem combinar inúmeras características favoráveis à extração de anticorpos, nomeadamente uma elevada biocompatibilidade e seletividade, possibilidade e facilidade de aplicação à escala industrial, com baixo custo associado, elevada produtividade e elevada estabilidade química e proteolítica [18]. Para além disso, os SAB permitem a integração do processo, podendo ser utilizados em etapas iniciais de purificação de bioprodutos, de forma a integrar a clarificação e captura destes a partir de um meio de cultura celular não-clarificado [4].

Face ao exposto, o objetivo deste trabalho prende-se com o desenvolvimento de uma plataforma eficaz para a extração seletiva e consequente purificação de anticorpos monoclonais, em particular da imunoglobulina G (IgG – anticorpo monoclonal (mAb) mamífero) do sobrenadante de culturas celulares, utilizando SAB constituídos por líquidos iónicos (LIs) como adjuvantes. O desenvolvimento desta nova tecnologia visa a obtenção de biofármacos menos dispendiosos, mais eficientes do que alguns dos atuais fármacos, e com os padrões de pureza necessários à indústria biofarmacêutica.

1.2. Mercado biofarmacêutico

O mercado biofarmacêutico tem vindo a crescer constantemente desde que a insulina recombinante humana Humulin, produzida por *Escherichia coli*, foi aprovada para o tratamento da diabetes no ano de 1982, tendo sido o primeiro biofármaco oficialmente aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos da América [19]. Mais tarde, em 1986, a proteína humana *tissue plasminogen activator* (tPA) tornou-se a primeira proteína terapêutica proveniente de células mamíferas a obter aprovação no mercado. Ainda durante esse ano, a FDA aprovou o primeiro anticorpo monoclonal

(mAb) terapêutico, Ortoclone OKT3, produzido *in vivo* por células de hibridoma [20]. Atualmente, existem cerca de 150 proteínas terapêuticas aprovadas nos Estados Unidos da América e na União Europeia, demonstrando a sua importância no tratamento de diversas patologias [21]. Para além disso, mais de 500 proteínas com potencial como biofármacos estão a ser avaliadas em ensaios clínicos, sendo que os avanços biotecnológicos em áreas como a genómica e proteómica têm exercido enorme relevância na descoberta desses novos candidatos [22]. O mercado global de produtos biofarmacêuticos estimado em US\$199,7 milhares de milhões no ano de 2013, foi projetado para atingir os US\$497,9 milhares de milhões no ano de 2020 [23].

Nos últimos 10 anos, tem-se verificado um crescente potencial comercial por parte dos anticorpos, tornando-se o tipo de biofármaco terapêutico mais utilizado em diversas áreas médicas e científicas, devido à sua capacidade de ligação a antígenos com elevado grau de afinidade e especificidade [24]. Com a progressão da medicina para uma nova era que visa a terapia personalizada, a utilização de mAbs permanece na linha da frente no que respeita ao tratamento de um espectro alargado de doenças. Em particular, os mAbs constituem o maior segmento de produção no mercado biofarmacêutico global, com uma participação estimada de 25,6% em 2013, contabilizando cerca de US\$75 milhares de milhões, sendo previsível que atinja os US\$125 milhares de milhões no ano de 2020 [25]. No período compreendido entre 2010 e 2015, previa-se que os mAbs conseguissem gerar por si só US\$25 milhares de milhões (Tabela 1), seduzindo deste modo, um número crescente de empresas a expandirem-se neste domínio, com a esperança de garantir um crescimento a longo prazo [26]. De facto, durante o ano de 2014, 36 das 50 companhias farmacêuticas mais relevantes no mercado (com exceção das empresas de genéricos), tiveram presença no setor dos mAbs terapêuticos/vacinas.

Tabela 1 – Vendas globais combinadas das 50 principais companhias farmacêuticas (excluindo as companhias de medicamentos genéricos) por tipo de molécula, no período compreendido entre 2010 e 2015 [26].

Vendas (US\$ milhares de milhões)							
Tipo de macromolécula	2010	2011	2012	2013	2014	2015	Diferença nas vendas entre 2010 e 2015
Pequenas moléculas	413	414	402	398	399	401	-12
Proteínas terapêuticas	70	73	76	79	81	81	11
Anticorpos monoclonais	46	52	57	62	67	71	25
Vacinas	24	25	28	30	31	32	8

Graças a esta demanda robusta do mercado, à aprovação de novos produtos e novas indicações, bem como ao lançamento de medicamentos genéricos de mAbs, prevê-se que

o tamanho do mercado global dos mAbs irá ascender em mais 12% no período 2013-2017, atingindo em 2017 os US\$141 milhares de milhões [27]. Em Junho de 2015, encontravam-se aprovados um total de 43 mAbs terapêuticos pela FDA e 5 encontravam-se ainda em revisão (Ver Anexo A – Tabela A. 1) [28].

Impulsionado pela perspectiva otimista do mercado, pelo avanço das tecnologias de mAbs e a breve expiração das patentes de vários medicamentos baseados em mAbs, por exemplo o infliximab (Remicade® da Johnson & Johnson), o trastuzumab (Herceptin® da Roche) e o adalimumab (Humira® da Abbott), a investigação e industrialização de mAbs tem vindo a ganhar um elevado destaque em termos de investimento global [27]. Assim, os anticorpos apresentam, comprovadamente, um papel relevante no mercado biofarmacêutico, quer a nível económico, quer ao nível da melhoria da eficiência do tratamento de diversas patologias. Apesar da eficácia e segurança dos mAbs para administração em humanos, em particular quando estes apresentam um elevado grau de pureza e mantêm as suas atividades específicas, o acesso a este tipo de terapêutica tem sido dificultado pelos elevados custos de produção associados, tornando impreterível o desenvolvimento de um método de purificação de anticorpos eficaz e economicamente viável [29, 30].

1.3. Anticorpos

Os anticorpos são proteínas que se encontram no plasma e fluídos extracelulares [24]. São um dos principais efetores do sistema imune adaptativo, e a sua produção prende-se com a resposta a moléculas e organismos (tais como bactérias, vírus, moléculas estranhas e outros agentes) que são neutralizados e/ou eliminados por estes. Os anticorpos tratam-se, portanto, de glicoproteínas excretadas por linfócitos B especializados (plasmócitos), podendo também ser designados por imunoglobulinas (Ig) uma vez que contêm um domínio estrutural encontrado em várias proteínas.

São várias as populações de Ig passíveis de serem encontradas à superfície dos linfócitos, em secreções exócrinas e em fluídos extravasculares [31]. Cada animal pode produzir milhões de anticorpos diferentes, cada um dos quais é capaz de se associar especificamente a uma partícula estranha, o antígeno [24]. Os linfócitos B que contêm recetores específicos, reconhecem e ligam-se a determinantes antigénicos do antígeno, promovendo um processo de divisão e diferenciação que transforma os linfócitos B em plasmócitos, que sintetizam predominantemente anticorpos [31].

A estrutura dos anticorpos é constituída por quatro cadeias polipeptídicas, nomeadamente por duas cadeias pesadas (com aproximadamente 55 kDa cada cadeia) e duas cadeias leves idênticas (com aproximadamente 25 kDa cada cadeia), organizadas em forma de “Y” [24]. Cada uma destas cadeias contém múltiplas regiões constantes e uma variável, associadas por ligações de dissulfureto e ligações não-covalentes, resultando numa molécula com peso molecular de aproximadamente 150 kDa, tal como se pode observar na Figura 1.

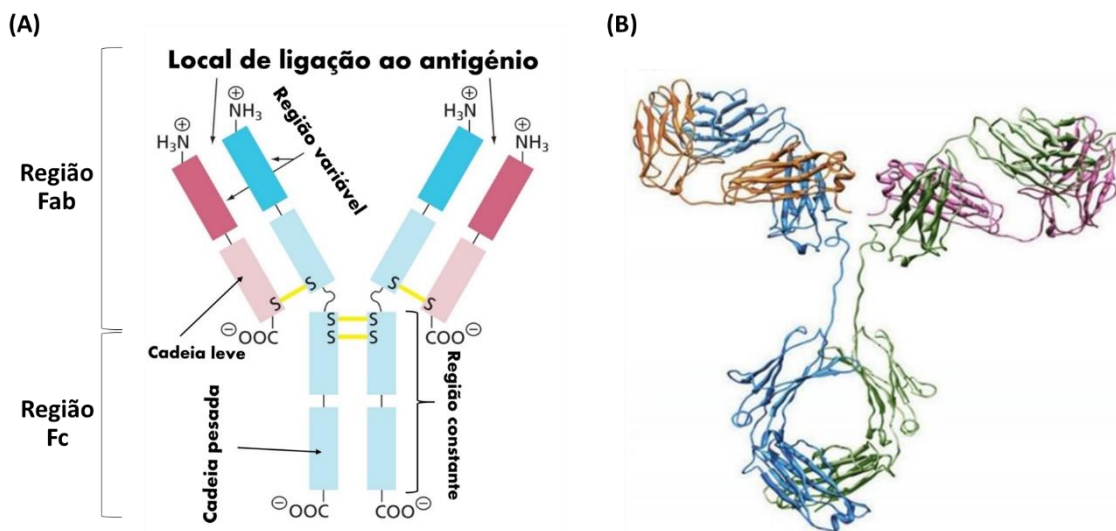


Figura 1 – (A) Representação esquemática de um anticorpo. Proteína com uma forma em “Y”, composta por duas cadeias leves (representadas a vermelho) e duas cadeias pesadas (representadas a azul). As cadeias pesadas apresentam três secções contantes (azul claro) e uma região variável (azul escuro). As cadeias leves apresentam uma região constante (rosa claro) e uma região variável (rosa escuro). A parte inferior do anticorpo é designada região Fc, à qual se encontram associados dois braços, as regiões Fab. As cadeias leves e pesadas associam-se por ligações de dissulfureto. Os domínios variáveis apresentam regiões determinantes de complementaridade (CDRs) que ligam diretamente ao antígeno. (B) Representação tridimensional de um anticorpo convencional. As cadeias pesadas encontram-se representadas a verde e a azul, enquanto que as cadeias leves da molécula se encontram representadas a laranja e rosa. Adaptado de Moran *et al* [32].

A ligação do anticorpo ao antígeno é feita no fragmento de ligação ao antígeno (Fab) através de regiões determinantes de complementaridade (CDRs). Estas CDRs são compostas por diferentes sequências de aminoácidos de acordo com o tipo de antígeno a que se associam, pelo que são designadas de regiões hipervariáveis [33]. As cadeias pesadas associadas por ligações de dissulfureto encontram-se localizadas numa região flexível designada de charneira, que contém aproximadamente 12 aminoácidos (essencialmente prolina, treonina, serina e cisteína) e que é bastante sensível à clivagem enzimática ou química [31]. Cada região globular formada pelo enrolamento das cadeias polipeptídicas resultante da ligação de dissulfureto é designada de domínio. Todas as cadeias polipeptídicas contêm regiões constantes (C) e regiões variáveis (V), encontradas

nos terminais carboxilo e amino, respetivamente. As cadeias leves contêm uma única região V e uma única região C, enquanto que as cadeias pesadas possuem igualmente uma região V e três regiões C. São as regiões V das cadeias leves e pesadas que, combinadas, formam dois locais idênticos de ligação a antígeno. No que concerne às funções destas cadeias, as cadeias pesadas são responsáveis por dar característica ao sistema imune, sendo que as cadeias leves são responsáveis por definir a especificidade de ligação ao antígeno. O efeito e função dos anticorpos, tal como o transporte placentar ou a toxicidade celular dependente de antígeno, são mediados por determinantes estruturais no fragmento cristalizável (Fc) da imunoglobulina.

Nos mamíferos, é possível encontrar cinco classes de Ig (dependendo da sequência primária de aminoácidos das cadeias pesadas presentes na sua constituição), nomeadamente a IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. Por sua vez, tanto a IgA como a IgG, encontram-se subdivididos em subclasses – os isotipos – devido aos polimorfismos verificados nas regiões conservadas da cadeia pesada [24]. Cada classe de Ig determina um tipo e natureza temporal da resposta imune. Atualmente, são conhecidos dois isotipos de IgA – IgA1 e IgA2, sendo que, relativamente à IgG, são conhecidos quatro isotipos – IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Numa perspetiva biotecnológica, a IgG apresenta-se como a classe de anticorpos mais importante, uma vez que são as Ig mais abundantes no sangue (representando 75% dos anticorpos aí presentes), e demonstram-se como o formato dominante de anticorpos terapêuticos [34].

A interação de um antígeno com um anticorpo é, evidentemente, crucial para as funções biológicas naturais desse mesmo anticorpo [24]. A especificidade da resposta de um anticorpo é mediada por células T e/ou B, através de recetores de membrana que ligam a um antígeno alvo de uma única especificidade. Após a ligação a um antígeno apropriado e consequente receção de vários sinais de ativação, os linfócitos B dividem-se, produzindo células B de memória e clones de plasmócitos secretores de anticorpos [31]. A memória dos linfócitos B permanece latente até serem posteriormente ativados pelo seu antígeno específico [24]. Os linfócitos providenciam, deste modo, a memória celular básica e consequente resposta do anticorpo quando exposto novamente ao seu antígeno específico. Devido à natureza altamente complexa da maioria dos antígenos, estes apresentam vários epitopes, que são reconhecidos por um vasto número de linfócitos.

Os anticorpos podem operar através de vários mecanismos, de forma a neutralizar potenciais efeitos lesivos por parte de organismos “estranhos”. De facto, assim que a

região Fab de um anticorpo se liga ao antígeno, é bloqueada a sua interação com outros ligandos, e é emitido um sinal agonista que desencadeia várias cascatas de sinalização [35]. Estas funções podem ser independentes da região Fc do anticorpo, contudo, as interações entre esta região e outras moléculas podem acelerar processo. Dois dos mecanismos pelos quais os anticorpos podem atuar, e que são dependentes da região Fc, são a citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) e/ou a citotoxicidade dependente do complemento (CDC). Nas respostas ADCC, os anticorpos ligam-se a antígenos nas células-alvo e o domínio Fc envolve receptores Fc que existam à superfície de células efectoras, tais como macrófagos e células NK (células exterminadoras naturais). Estas células, por sua vez, despoletam o processo de fagocitose ou lise da célula-alvo. No caso das respostas CDC, os anticorpos eliminam as células-alvo despoletando a cascata de complemento à superfície da célula.

Os anticorpos podem ser distinguidos em anticorpos monoclonais (mAbs) e anticorpos policlonais (pAbs), sendo que as diferenças entre si definem as limitações de utilização de cada tipo de anticorpo [24]. A decisão relativamente à escolha do tipo de anticorpos a utilizar depende, portanto, de vários fatores, sendo o mais importante o objetivo para o qual são requeridos, uma vez que cada tipo apresenta as suas próprias vantagens e desvantagens no que concerne à sua produção, custos e aplicações.

Como já foi referido anteriormente, a maioria dos antígenos são altamente complexos, apresentando inúmeros epitopes que são reconhecidos por um vasto número de linfócitos [36]. Cada linfócito é ativado de forma a proliferar e diferenciar-se em plasmócitos, e o anticorpo resultante é policlonal. De facto, o soro trata-se de uma excelente fonte de anticorpos policlonais, dado que são frequentemente produzidos em animais e reconhecem epitopes independentes no antígeno, sendo capazes de se ligar a diferentes substâncias [24]. Contrariamente a este caso, os anticorpos monoclonais tratam-se de anticorpos produzidos por um único clone de um linfócito B, resultando numa população de anticorpos idênticos entre si [37].

Os pAbs podem ser produzidos muito mais rapidamente, com custos associados reduzidos, e não requerem técnicos com aptidões e competências técnicas tão específicas, comparativamente com a produção de mAbs [38]. Assim sendo, como estes anticorpos são heterogéneos e reconhecem um espectro alargado de epitopes à superfície de determinados antígenos, estes podem ser bastante úteis na amplificação do sinal de uma proteína-alvo que apresente baixos níveis de expressão, uma vez que a proteína-alvo se liga a mais do que um anticorpo nos múltiplos epitopes [24]. Mais ainda, os pAbs

apresentam-se mais tolerantes a eventuais mudanças que ocorram num reduzido número de epitopes, tais como polimorfismos, glicosilação ou leve desnaturação. Para além disso, estes anticorpos apresentam maior estabilidade numa gama mais alargada de pH e de concentração de sal, enquanto que os mAbs são muito mais suscetíveis e pequenas alterações em ambos os parâmetros devido à inexistência de variabilidade entre si.

No que concerne aos mAbs, estes têm sido alvo de uma intensa investigação desde que a sua produção foi possível em 1975, quando G. Kohler e C. Milstein publicaram um artigo relativo aos métodos de produção destes anticorpos, obtendo posteriormente, no ano de 1984, o prémio Nobel da Medicina [39]. A elevada especificidade dos mAbs, dado que apenas podem interagir com uma substância específica, revela-se como uma excelente vantagem, principalmente para fins terapêuticos, mas também para a avaliação de alterações em conformações moleculares, interações proteína-proteína, estados de fosforilação/glicosilação, e na identificação de membros únicos de famílias de proteínas [24]. Esta especificidade revela-se também bastante atrativa para inúmeros ensaios clínicos e testes de diagnóstico laboratorial tais como a deteção e identificação de analitos, marcadores celulares, agentes patogénicos, entre outros [38]. Contudo, a sua monoespecificidade pode também ser considerada uma limitação, uma vez que a ocorrência de pequenas alterações na estrutura de um epítotope pode afetar por completo a função do anticorpo. Por fim, uma outra vantagem fundamental dos mAbs está relacionada com o facto de que, assim que o hibridoma desejado tenha sido gerado, os mAbs podem ser produzido através de uma fonte constante e renovável, permitindo um fornecimento contínuo e reprodutível de anticorpos. Os pAbs produzidos para o mesmo antígeno utilizando múltiplos animais irão diferir entre os animais imunizados, a sua avidéz pode alterar-se à medida que estes são recolhidos ao longo do tempo, assim como a quantidade obtida enfrenta limitações de acordo com o tamanho do animal e o seu tempo de vida útil. Finalmente, os pAbs apresentam frequentemente melhor especificidade relativamente aos mAbs, uma vez que são produzidos por um vasto número de clones de células B, com cada clone a produzir anticorpos específicos para um epítotope [24]. Contudo, a concentração e níveis de pureza de anticorpos específicos é superior nos mAbs. A concentração de anticorpos específicos no soro policlonal situa-se tipicamente entre os 50 – 200 µg/mL, e a gama de concentração total de Ig no soro varia entre os 5 – 20 mg/mL.

Constata-se, portanto, que a principal diferença entre ambos os tipos de anticorpos reside na maior especificidade apresentada pelos mAbs. Naturalmente que este tipo de

anticorpos apresenta algumas desvantagens associadas à sua utilização, porém, de um modo geral, muitas dessas desvantagens poderão ser ultrapassadas com a utilização de vários mAbs com as especificidades desejadas. O produto combinado será consistente ao longo do tempo e estará disponível em quantidade ilimitada. Contudo, é geralmente difícil, dispendiosa e morosa a identificação de múltiplos mAbs de especificidade desejada. No vasto espectro de mAbs terapêuticos existentes atualmente, a IgG destaca-se entre as moléculas efectoras mais potentes da imunidade humoral, e apresenta um papel essencial no reconhecimento e combate de organismos “estranhos”. Nesse sentido, este anticorpo tem vindo a ser crescentemente utilizado como biofármaco alternativo para o tratamento de várias patologias [40].

1.4. Imunoglobulina G (IgG)

A imunoglobulina G (IgG) é a classe principal de anticorpos presentes no sangue, no fluído linfático, no fluído peritoneal e no fluído cérebro-espinal [41], representando cerca de 20% das proteínas plasmáticas totais, com uma concentração total no sangue compreendida entre os 10-25 mg/mL [40, 42].

A unidade básica de todos os isotipos de IgG consiste em quatro cadeias polipeptídicas, compreendendo duas cadeias leves idênticas (zona constante do tipo κ ou λ) e duas cadeias pesadas idênticas (zona constante do tipo γ) [42]. Essas cadeias encontram-se associadas por ligações covalentes (pontes de dissulfureto) e não-covalentes, formando uma estrutura tridimensional globular bem definida. No ano de 1960, foram identificadas quatro sub-classes de IgG em amostras de sangue humano, nomeadamente a IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, tal como é possível visualizar na Figura 2, e que decrescem por esta ordem em termos de abundância [43].

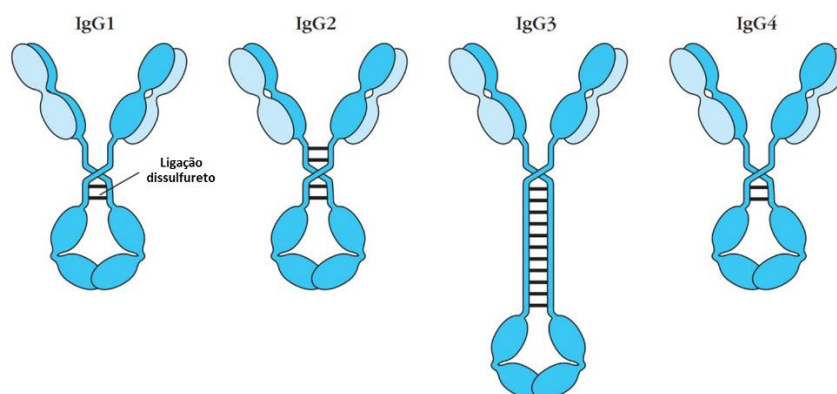


Figura 2 – Estrutura geral das quatro sub-classes de IgG humana, que diferem entre si no número e disposição das ligações de dissulfureto intercadeia (linhas pretas) que ligam as cadeias pesadas. Adaptado de Owen *et al.* [43].

Embora todas as sub-classes da proteína partilhem de uma base genética comum, de um tamanho idêntico bem como de uma conformação semelhante, estas apresentam diferenças na sequência específica de aminoácidos nos domínios constante da sua estrutura, em especial na região de charneira e no domínio C_{H2} [40, 42]. Assim, todas as sub-classes existem em diferentes espécies, e torna-se importante explorar a sua composição bioquímica e propriedades moleculares, dado que estas se encontram na base das suas funções biológicas.

Visando o isolamento e purificação deste tipo de anticorpos, existem vários fatores que devem ser tomados em consideração, baseados em informações físico-químicas e propriedades biológicas das moléculas pertencentes a esta classe de Ig. Entre eles, é importante destacar as suas massas moleculares, pontos isoelétricos, bem como a sua afinidade para determinadas substâncias (tais como as proteínas A/G bacterianas). A IgG contém dois fragmentos Fab utilizados para ligação específica a antígenos, e um fragmento Fc contendo a função efetora do anticorpo [44]. As IgGs são proteínas mais pequenas e com maior tempo de meia-vida comparativamente com as outras classes de Ig's, e durante o processo de isolamento e purificação, apresentam maior estabilidade que as restantes classes, dado que não formam agregados e não requerem o uso de estabilizantes numa gama de pH compreendida entre 4 a 5 [45, 46]. Na Tabela 2 é possível verificar uma compilação das principais propriedades das sub-classes de IgG humana [47].

Tabela 2 – Propriedades principais das sub-classes de IgG humana. Adaptado de Nikolayenko *et al.* [47].

	Isotipo de imunoglobulina G			
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Cadeia pesada	γ_1	γ_2	γ_3	γ_4
Cadeia leve	κ, λ	κ, λ	κ, λ	κ, λ
Coefficiente de sedimentação	7S	7S	7S	7S
Massa molecular (kDa)	146	146	170	146
Ponto isoelétrico (pI)	8,6	7,4	8,3	7,2
Concentração média no soro (mg/mL)	9,0	3,0	1,0	0,5
Tempo de meia-vida (dias)	21	20	7	21
Porção do total de Ig no soro (%)	50	17	5	3
Conteúdo em hidratos de carbono (%)	2 – 3	2 – 3	2 – 3	2 – 3
Coefficiente de extinção E_{280nm} (1%, 1cm)	13,6	13,6	13,6	13,6
Ligação a proteína A	+	+	-	+
Ligação a proteína G	+	+	+	+

Devido ao facto de as quatro subclasses de IgG apresentarem pontos isoelétricos (pI) diferentes, o pI dessa proteína encontra-se compreendido entre 7.2 e 8.6, sendo diretamente influenciado por cada uma das subclasses [48]. Algo importante a destacar é

a massa molecular de 146 kDa que é comum a três isotipos de IgG, sendo que o IgG3 apresenta uma massa molecular ligeiramente superior – 170 kDa [47]. Esta massa molecular é, provavelmente, resultado das 11 ligações de dissulfureto intercadeia características desta molécula, tal como se pode verificar na Figura 2, que por conter mais elementos para a formação das ligações também experiencia um incremento na sua massa molecular. A IgG1 é o isotipo mais abundante no soro com uma percentagem média de 50%, sendo que em relação às restantes características estas revelam-se semelhantes entre os 4 isotipos. Finalmente, é importante destacar a capacidade de ligação à proteína A/G que é comum a todos os isotipos, exceto à IgG3, cuja ligação à proteína A não é possível.

Os anticorpos apresentam uma utilização bastante extensa em variadas aplicações *in vivo* e *in vitro*. Atualmente, a IgG é o tipo de anticorpos mais utilizado numa variedade de aplicações científicas, médicas e terapêuticas [49]. Em particular, este anticorpo tem um elevado potencial para utilização em imunoterapia passiva. Esta imunidade passiva é conferida através da transferência de anticorpos específicos contra um determinado agente patogénico para um hospedeiro, e distingue-se da imunidade ativa pois esta é conferida pela resposta do próprio hospedeiro a um determinado antígeno do agente patogénico, tal como se pode visualizar na Figura 3.

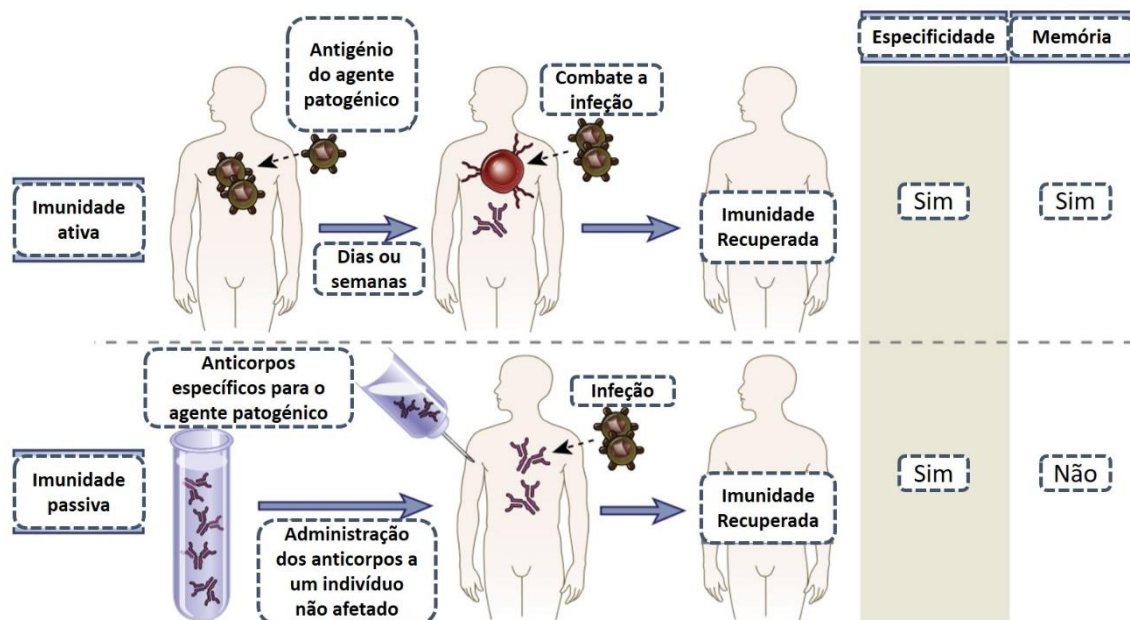


Figura 3 – Imunidade ativa vs. imunidade passiva. Adaptado de Abbas *et al.* [33].

A nível de diagnóstico, a IgG são os reagentes de reconhecimento biológico ideais, e nesse sentido, a sua utilidade recai sobre inúmeras plataformas analíticas como o Western Blotting (immunoblotting), imunohistoquímica, imunocitoquímica, imunoprecipitação, ensaio imunossorvente ligado a enzimas (ELISA), microarrays de anticorpos,

imunocintigrafia, ensaios radioimunológicos, análises por citometria de fluxo, imunossensores, reações em cadeia de imuno-polimerase (IPCRs) e real-time IPCRs [45]. Estes anticorpos são também utilizados como importantes ferramentas em cromatografia de imunoafinidade [50], na identificação e localização de proteínas intracelulares e extracelulares [24], e são utilizados para a detecção de agentes patogênicos, adulterantes, toxinas, e/ou outros resíduos (drogas, químicos ou pesticidas) em produtos alimentares e em análise/monitorização ambiental [50]. Relativamente às suas aplicações terapêuticas, é importante salientar a sua importante utilização na terapia de IgG intravenoso (IVIG). Esta terapia pode ser aplicada a pacientes com doenças inflamatórias e auto-imunes (tais como Esclerose Múltipla, Doença de Crohn, entre outras), bem como em pacientes com asma, doenças cardiovasculares ou doenças infecciosas [46, 51]. Finalmente, uma outra aplicação fundamental da IgG é na oncologia, em que atua como agente transportador de toxinas ou radioisótopos para as células cancerígenas [49].

Todas as principais aplicações da IgG são resultado do elevado grau de afinidade e especificidade deste anticorpo para um antígeno alvo, comparativamente com outros anticorpos [24]. Assim sendo, a sua utilização e aplicação apresenta-se preferencial, permitindo tirar partido da sua elevada especificidade para aplicações essencialmente terapêuticas, e que exigem esse elevado grau de especificidade/afinidade, promovendo um incremento na melhoria da saúde humana.

1.5. Processamento a montante de mAbs

O sucesso clínico e comercial dos mAbs promoveu uma crescente necessidade da sua produção em larga escala recorrendo a culturas celulares de mamíferos. Nesse sentido, observou-se uma rápida expansão da capacidade de produção global, um aumento no tamanho dos reatores e um crescente esforço no sentido de melhorar a eficiência do processo, com conseqüente redução dos custos de produção [52].

A tecnologia de hibridoma baseia-se numa linha celular de origem em murino, e trata-se da primeira tecnologia que permitiu a produção de grandes quantidades de mAbs [53]. Atualmente, este tipo de proteínas terapêuticas são sintetizadas através do cultivo em larga escala de células hospedeiras geneticamente modificadas, que contêm genes transfetados que codificam para as proteínas de interesse [54]. Contudo, a escolha das células hospedeiras para a expressão da proteína tem um profundo impacto nas características do produto obtido, bem como dos rendimentos máximos atingíveis. Para

estas proteínas terapêuticas serem eficazes, têm de ser sintetizadas em formas biologicamente ativas, o que requer o enrolamento apropriado e modificações pós-traducionais, tais como a glicosilação. São estas que ditam as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas dos produtos, e consequentemente a sua solubilidade, estabilidade, atividade biológica e tempo de residência nos seres humanos [55]. A segurança do produto é um outro aspeto fundamental e que deve ser considerado na escolha das células hospedeiras. Estas não devem permitir a propagação de quaisquer agentes patogénicos adventícios que podem, eventualmente, encontrar um modo de chegar aos seres humanos. Finalmente, as células hospedeiras devem ser ainda passíveis de modificações genéticas, que permitam a fácil introdução de ADN “estranho”, e a expressão de grandes quantidades da proteína pretendida.

1.5.1. Tecnologia Híbridoma

Os mAbs foram reconhecidos pela primeira vez no soro de pacientes com mieloma múltiplo, no qual a expansão clonal de plasmócitos malignos levou à produção de elevados níveis de anticorpos idênticos, resultando numa gamopatia monoclonal [24]. A descoberta destes anticorpos monoclonais produzidos pelos tumores permitiu estabelecer a analogia de que poderia ser possível produzir mAbs similares com uma especificidade desejada através da imortalização de células secretoras de anticorpos individuais a partir de um animal imunizado com um antígeno conhecido. No ano de 1975, Georges Köhler e Cesar Milstein demonstraram que clones individuais de células secretoras de anticorpos normais podiam ser imortalizadas através da fusão com células de mieloma [53]. Os autores desenvolveram uma técnica designada de tecnologia híbridoma, que consistia na fusão de células B de um animal imunizado (normalmente um rato) com uma linha celular de mieloma, fazendo crescer as células sob condições nas quais as células normais e tumorais não-fundidas não cresciam. Neste procedimento, as células B de um rato foram imunizadas com um antígeno ou mistura de antígenos conhecidos, e seguidamente procedeu-se à sua fusão com uma linha celular de mieloma deficiente numa determinada enzima [33]. Seguidamente, estas células híbridas foram colocadas num meio de seleção que apenas permite a sobrevivência dos híbridos imortalizados. Esses híbridos crescem depois como clones de uma única célula e foram testados para a secreção do anticorpo de interesse. O meio de seleção utilizado incluía hipoxantina, aminopterina e timidina, pelo que é designado de meio HAT. Cada híbridoma produz apenas uma Ig, e os anticorpos

secretados por vários clones de hibridomas foram monitorizados de modo que o clone com a especificidade desejada possa ser selecionado e expandido posteriormente. Os produtos destes clones individuais eram, então, anticorpos monoclonais específicos para um único epítipo em um antígeno ou mistura de antígenos.

No final dos anos 80, iniciaram-se os desenvolvimentos clínicos envolvendo mAbs murinos, contudo, as primeiras gerações de agentes terapêuticos apresentaram alguns inconvenientes na sua utilização em humanos. De facto, os mAbs murinos encontram-se associados a reações alérgicas devido à indução de anticorpos anti-drogas (AADs) nomeadamente o desenvolvimento de respostas de anticorpos humanos anti-rato; por outro lado exibem um tempo de meia-vida relativamente curto no soro, comparativamente com a IgG humana, e têm uma ativação insuficiente das funções efetoras humanas, nomeadamente a ADCC e a CDC, fundamentais para a sua eficácia, especialmente em casos oncológicos [56, 57]. No sentido de colmatar estes problemas, Boulianne *et al.* (1984) e Morrison *et al.* (1984) desenvolveram anticorpos quiméricos rato-humano através de técnicas de engenharia genética, enxertando o domínio variável específico para um determinado antígeno com os domínios constantes dos anticorpos humanos [58, 59]. Esta nova técnica permitiu a obtenção de moléculas 65% humanas, e que apresentam, consequentemente, um tempo de meia-vida superior nos humanos e uma menor imunogenicidade. Neste sentido, Jones *et al.* (1986) propuseram alterações e melhorias a estes anticorpos, enxertando apenas as regiões hipervariáveis de murinos na estrutura humana [60]. Os anticorpos resultantes são aproximadamente 95% humanos, sendo os que contêm menos problemas imunogénicos. Contudo, a humanização é limitada e requer um processamento laboratorial moroso e complexo. Na Figura 4 é possível visualizar os vários tipos de anticorpos passíveis de serem obtidos através de engenharia genética, bem como a sua classificação tendo em conta a origem das suas sequências.

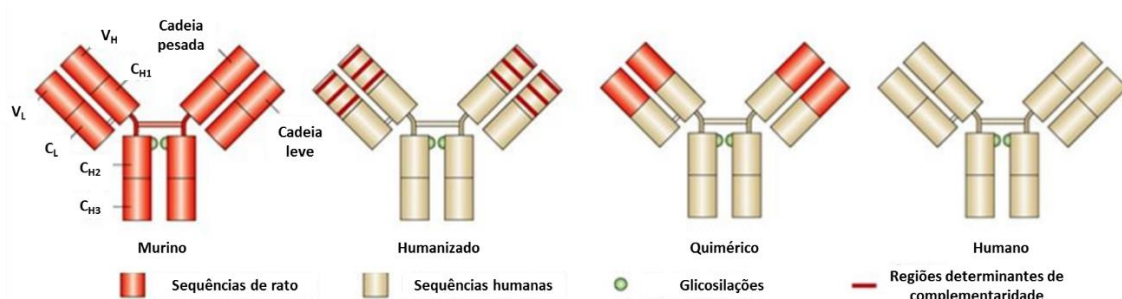


Figura 4 – Humanização de anticorpos através de engenharia genética. Os mAbs podem ter origem em murino (100% proteína de rato) [sufixo: -omab], quiméricos (compostos por aproximadamente 35% de sequências de rato) [sufixo: -ximab], humanizados (possuem apenas 5-10% de regiões de rato) [sufixo: -zumab] ou totalmente humanos (100% proteína humana) [sufixo: -umab]. Adaptado de Carter *et al.* [61].

Visando a obtenção de mAbs totalmente humanos, nos últimos anos surgiram e foram aplicadas novas técnicas *in vitro*, nomeadamente a técnica de *phage display*, na qual os anticorpos são expressos à superfície de um fago que é utilizado para infectar a *E. coli*, que irá posteriormente replicar e produzir o anticorpo desejado, bem como *in vivo*, através da criação de ratos transgênicos que expressam domínios variáveis humanos acoplada à tecnologia hibridoma, permitindo a produção de anticorpos monoclonais totalmente humanos com um baixo potencial imunogénico e propriedades similares aos anticorpos endógenos humanos [62, 63]. Em termos clínicos, não parecem existir diferenças entre os anticorpos monoclonais isolados utilizando técnicas de apresentação de fagos ou ratos transgênicos. No entanto, o processo de descoberta de um anticorpo por técnicas de apresentação permite um isolamento mais direto e também um maior controlo sob a especificidade e afinidade do anticorpo. Todas estas técnicas providenciam complementaridade entre si, de maneira que a produção de anticorpos monoclonais encontra-se atualmente bastante acessível.

1.5.2. Tecnologia de ADN recombinante

O desenvolvimento de sistemas de expressão eficientes é essencial para a exploração do potencial dos anticorpos, quer em termos de eficácia quer em termos dos custos inerentes à produção dos mesmos [64]. A expressão de anticorpos funcionais, com o enrolamento correto e possíveis de aplicar a uma escala industrial é o objetivo primário no desenvolvimento de anticorpos terapêuticos. Uma vez que as terapias baseadas na utilização de anticorpos requerem largas doses de anticorpos durante longos períodos de tempo, a capacidade de produção tornou-se um problema, na medida em que o biofármaco deve ser produzido em grandes quantidade e com um custo e tempo de produção eficientes, de forma a enquadrar-se nos requisitos clínicos [65].

As células de mamíferos apresentam-se como o sistema de expressão de eleição para a produção de mAbs em larga escala, e o seu sucesso é maioritariamente devido à sua capacidade de produzir mAbs bioquimicamente similares à forma humana, uma vez que produzem anticorpos com a estrutura, o enrolamento e as modificações pós-traducionais corretas. Para além disso, estas são ainda capazes de se adaptarem a culturas em bioreatores de larga escala, produzindo elevadas quantidades de anticorpos com qualidade consistente [52]. Em particular, a linha celular obtida a partir de ovário de hamster chinês (CHO) são a linha celular mais vastamente utilizada para a produção de

mAbs em larga escala [66]. Estas células foram isoladas pela primeira vez em 1958 por Joe-Hin Tjio *et al.* e rapidamente ganharam reconhecimento devido à sua facilidade e rápido tempo de cultura [67]. Atualmente, esta linha celular consiste no hospedeiro de produção de aproximadamente 70% de todas as proteínas terapêuticas recombinantes [68]. A sua ampla utilização como veículo principal de produção de mAbs está relacionada com diversas razões, nomeadamente: demonstraram segurança ao longo de duas décadas, o que facilita a obtenção de aprovação por parte de agências reguladoras como a FDA [54]; são passíveis de se aplicarem técnicas de amplificação genética, tal como a utilização da di-hidrofolato redutase (DHFR) ou a glutamina sintase (GS), que permitem atenuar a baixa produtividade específica que dificulta a produção de proteínas recombinantes em células de mamíferos [68, 69]; possuem o repertório molecular adequado para a ocorrência de modificações pós-traducionais semelhantes à nativa com glicoformas comparáveis às dos humanos, exibindo, consequentemente, atividade molecular semelhante [70]; crescem adequadamente em culturas em suspensão isentas de soro, muitas vezes em bioreatores de aço inoxidável ou mesmo descartáveis [71]; é possível o seu aumento de escala [70]. Existem ainda vantagens adicionais que fundamentam o grande sucesso desta linha celular, nomeadamente o facto de vírus patogénicos humanos, tais como o HIV, influenza e polio, não replicarem em células CHO, aumentando a segurança dos mAbs produzidos e consequentemente resultando num processo de purificação mais simples [72], e o facto de serem facilmente modificadas geneticamente para otimização do processo de produção [54].

Seguidamente às células CHO, as linhas celulares mais utilizadas para a produção de mAbs são as células linfoides de murino NS0 e SP2/0, uma vez que são originadas a partir de células B diferenciadas que produzem elevadas quantidades de Igs. Contudo, estas não são a cultura celular principal para a produção de mAbs pois os anticorpos que estas produzem podem conter resíduos imunogénicos, resultando num tempo de meia-vida reduzido quando administrados *in vivo* [73]. A utilização de células de fontes humanas é uma opção que permite eliminar a presença de grupos antigénicos nos anticorpos produzidos. Existem atualmente várias possibilidades que estão a ser estudadas, nomeadamente as células embrionárias humanas derivadas do rim HEK293, os amniócitos humanos imortalizados da CEVEC e as células embrionárias humanas derivadas dos retinoblastos PER.C6 da Crucell [74]. Embora as HEK293 e os amniócitos estejam reportados como sendo os mais adequados para a produção de proteínas, as PER.C6 são consideradas como as candidatas mais promissoras uma vez que são as mais

produtivas e que podem atingir densidades celulares 10 vezes superiores às células CHO, produzindo mais de 27 g/L de proteína em reatores [74, 75]. Embora as linhas celulares humanas estejam ainda sujeitas a problemas de regulamentação devido à sua baixa resistência contra agentes adventícios, vários produtos derivados das PER.C6 encontram-se atualmente na fase de ensaios clínicos [74].

A seleção do sistema de expressão adequado é determinada pela sua capacidade de: i) produzir elevadas concentrações do bioproduto, ii) produzir consistentemente os anticorpos com as características desejadas (como por exemplo o padrão de glicosilação), iii) atingir um elevado rendimento da linha celular e iv) crescer em suspensão [52]. Linhas celulares altamente produtivas resultam da utilização de uma linha celular hospedeira com as características desejadas, um sistema de expressão apropriado e um protocolo de transfeção e seleção adequado. Assim sendo, no que concerne ao processo de desenvolvimento de linhas celulares, este inicia-se com a transfeção das células mamíferas com vetores plasmídicos, contendo os genes das cadeias leves e cadeias pesadas do anticorpo de interesse e ainda genes marcadores de seleção, que permitem a seleção das células transfetadas conferindo resistência a determinados antibióticos ou vantagens no crescimento/desenvolvimento em condições deficientes em determinados nutrientes [76]. No caso das células CHO DG44 ou DXB11 deficientes na enzima dihidrofolato redutase (DHFR), utiliza-se um marcador DHFR que confere a capacidade de reduzir o dihidrofolato a tetrahydrofolato, um metabolito necessário para o metabolismo dos ácidos nucleicos, permitindo então que apenas as células que incorporaram o vetor com o gene DHFR sobrevivam num meio sem hipoxantina e timidina [76, 77]. A amplificação do produto também pode ser conseguida através da adição de metotrexato ao meio, o qual inibe a atividade da DHFR, de modo que as células iniciam a amplificação do gene DHFR para garantirem a sua sobrevivência, resultando numa amplificação simultânea dos genes do anticorpo monoclonal [78]. Um outro exemplo é o do marcador de seleção glutamina sintetase (GS) que catalisa a formação de glutamina a partir de glutamato e amónia, e que é utilizado nas células NS0 deficientes na expressão deste gene, permitindo que as células transfetadas sobrevivam num meio sem glutamina [79, 80]. Uma vez mais, a amplificação pode ser conseguida através da adição de metionina sulfoximina, um inibidor da GS, cuja ação é semelhante ao metotrexato com a DHFR, forçando as células a amplificar o vetor que inclui o gene do anticorpo monoclonal [80]. Estando concluída a seleção e amplificação das células transfetadas, são escolhidos clones únicos para caracterização da qualidade do produto,

aplicação a uma escala industrial e avaliação da expressão a longo termo. É importante referir que a integração e a amplificação aleatória origina produtos bastante heterogêneos, fazendo com que o processo de produção e seleção de clones seja demorado e bastante trabalhoso [76]. Nesse sentido, têm surgido desenvolvimentos recentes para a seleção de clones com elevada eficiência de produção utilizando automação, de maneira a reduzir o tempo dispensado e melhorar a consistência do processo. A citometria de fluxo aplicada à separação de células ativada por fluorescência permite uma rápida monitorização de milhões de células para isolar subpopulações específicas de vários produtos extremamente heterógenos, e pode ser aplicada à separação de células produtoras de anticorpos marcados à superfície, uma vez que os níveis de proteínas excretadas são proporcionais aos níveis de proteínas encontradas à superfície da célula [81].

1.5.3. Meios de cultura

As células mamíferas são extremamente sensíveis ao meio de cultura em que se encontram inseridas, pelo que se torna bastante relevante a seleção dos meios de cultura, dado que estes têm uma influência significativa na performance do processo [82]. Uma otimização individual do meio pode, normalmente, melhorar os níveis de produção entre 2 a 5 vezes [83]. As células de mamíferos necessitam de ser suplementadas com um meio complexo contendo todos os nutrientes essenciais para o metabolismo celular, crescimento e proliferação, incluindo frequentemente vitaminas, aminoácidos, nucleótidos, lípidos, precursores, protetores, agentes redutores e ainda fatores de crescimento, que variam de acordo com a linha celular e com os clones selecionados [82]. Estas células mamíferas apresentam uma enorme capacidade de se adaptarem a novas formulações do meio, voluntariamente ou involuntariamente induzindo a seleção de variantes celulares.

A linha celular original de células CHO estabelecida em 1958 cresceu num meio semi-definido, conhecido como Ham's F12, suplementado com 4-8% de soro bovino fetal (FBS) [67]. Este é um meio rico contendo prolina, requerida por todas as células CHO, bem como uma variedade de outros micronutrientes. Atualmente, e de um modo geral, existem vários meios disponíveis específicos para determinadas linhagens celulares, tais como: o meio mínimo essencial (MEM), um meio não-complexo adequado para uma enorme variedade de células mamíferas quando utilizado com um suplemento de soro; o meio basal de Eagle (BME), originalmente criado como um meio quimicamente definido

para o crescimento de células HeLa num sistema deficiente em soro; o Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), contendo elevadas concentrações de vitaminas, aminoácidos e aminoácidos não-essenciais, elementos vestigiais e bicarbonato, o qual é vastamente utilizado para o suporte do crescimento de um largo espectro de células mamíferas; finalmente o meio do *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) utilizado no crescimento de células do hibridoma [84].

Uma opção que providencia as condições necessárias ao desenvolvimento das células consiste na utilização de componentes derivados de animais, tal como o soro, que proporciona um ambiente mais natural para um melhor crescimento celular. O soro fetal bovino (FBS) tem sido o meio de eleição uma vez que providencia todos os nutrientes necessários que permitem o crescimento celular e a produtividade das células [85]. Para além dos componentes mais gerais como os nutrientes de baixo peso molecular, anti-oxidantes, proteínas macromoleculares e proteínas transportadoras (para componentes insolúveis em água), este meio também contém fatores anti-apoptóticos muito importantes e albumina que auxilia a célula na sua proteção contra fatores de *stress*. Embora existam vantagens associadas à sua utilização, o FBS está também associado a sérios problemas de segurança dos biofármacos produzidos, uma vez que determinadas substâncias derivadas de animais podem potencialmente introduzir contaminantes no processo e, conseqüentemente, no produto final [82]. Estas substâncias de origem animal representam assim alguns riscos, dado que podem ser uma fonte da transmissão de príões e micoplasma e ainda de contaminações virais [86, 87]. Uma outra desvantagem é a sua variabilidade de lote para lote, que pode culminar numa inconsistência do processo e do produto final, para além do complexo processamento a jusante requerido para remover todas as impurezas introduzidas pelo soro [82].

Os anticorpos monoclonais são cada vez mais utilizados como agentes terapêuticos, e por isso a sua produção está cada vez mais sujeita a uma crescente regulamentação, estando esta cada vez mais focada no sentido de garantir que a produção dos biofármacos se encontra isenta de potenciais contaminações por agentes adventícios de origem animal [82]. No sentido de se atingirem melhores formulações da composição dos meios, reduzir a probabilidade de contaminação por agentes adventícios e infecciosos, e reduzir os custos, a indústria tem adotado a utilização de meios livres de soro. Contudo, para preservar as funções benéficas multifacetadas do soro, muitos destes meios contêm ainda alguns componentes macromoleculares derivados de bovino, nomeadamente algumas proteínas

como a albumina, insulina, transferrina e lipoproteínas que desempenham importantes funções de transporte de nutrientes e são facilitadoras do metabolismo celular [88, 89].

Uma vez que quaisquer proteínas derivadas de animais acarretam teoricamente um risco de introdução de príões [90] ou outros agentes adventícios [91], tornou-se altamente desejável o desenvolvimento de um meio livre de proteínas para os processos de cultura celular [92]. Embora sejam frequentemente utilizadas proteínas recombinantes para substituir os seus homólogos de origem animal, a utilização de pequenas moléculas orgânicas ou inorgânicas quando possível pode reduzir dramaticamente o custo do meio e minimizar alguns riscos indiretos, tais como os que possam advir da fermentação das matérias-primas utilizadas para a produção das proteínas recombinantes que compõe o meio [82]. Mais ainda, as formulações do meio podem ser totalmente livres de componentes de origem animal, uma vez que todos estes componentes, incluindo pequenas moléculas como aminoácidos que são habitualmente derivados de animais, encontram-se disponíveis a partir de meios de fermentação ou de fontes sintéticas ou vegetais [93, 94]. Para além dos meios livres de proteínas animais, também foram desenvolvidos e disponibilizados comercialmente meios livres de proteínas para células CHO e NS0, e alguns encontram-se inclusive reportados na literatura [93, 95, 96]. Este tipo de meios contém apenas os elementos não-proteicos necessários para o crescimento celular, promovendo um maior crescimento celular e expressão proteica, e tornando, consequentemente, o processamento a jusante mais fácil e economicamente acessível. A pureza dos anticorpos monoclonais no momento da colheita é inferior a 30% numa cultura otimizada contendo proteínas, enquanto que numa cultura otimizada livre de proteínas essa pureza consegue atingir níveis de 60-75% [97].

Uma outra alternativa são os meios quimicamente definidos e que já foram reportados para o suporte de culturas celulares de elevada densidade e para facilitar o desenvolvimento de atividades numa escala reduzida [93, 98]. Este tipo de meio é menos dispendioso e permite um processamento a jusante mais direto, uma vez que todas as impurezas são conhecidas e se encontram presentes em reduzidas quantidades [97]. Para além disso, a utilização de um ambiente bem definido também facilita consideravelmente o processo de otimização. Contudo, alguns destes meios ainda incluem proteínas recombinantes como a insulina, transferrina e fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 como sinais para o crescimento celular [7]. No entanto, um meio quimicamente definido apenas deve conter componentes bem caracterizados, com identidade, estrutura e perfis de purezas/impurezas conhecidos, podendo por isso conter componentes como o

colesterol, galactose e aminoácidos, mas não deve incluir elementos proteicos que sejam menos definidos. Quando estes meios contêm quantidades mínimas de pequenas proteínas são, normalmente, designados de meios de baixo teor em proteínas [88].

Finalmente, torna-se importante mencionar que, embora tenham sido desenvolvidos meios de cultura celular seguros e otimizados, as alternativas livres de soro requerem um período de adaptação das células às novas condições, o que é extremamente moroso e dispendioso, especialmente considerando que a performance de um meio é dependente da história da cultura, e as conclusões acerca da eficácia de um novo meio pode apenas ser obtida após múltiplas passagens das células [82]. Outras dificuldades incluem as vastas variações nos métodos de avaliação dos meios, tal como a avaliação do crescimento por contagem celular, que pode variar entre 10-20%, e ainda a enorme quantidade de componentes que podem estar presentes num típico meio de cultura celular, e que tornam extremamente difícil a total otimização da composição do meio. Mais ainda, a adaptação a meios livres de soro nem sempre é possível ou adequada, uma vez que diferentes clones do mesmo tipo de células requerem, frequentemente, formulações distintas, pelo que o meio deve ser preparado de acordo com as necessidades das células utilizadas [99].

1.6. Processamento a jusante de mAbs

Tal como referido anteriormente, o processamento a montante de mAbs tem sofrido inúmeros avanços nos últimos tempos, nomeadamente nas tecnologias de culturas celulares que permitem a obtenção de maiores níveis de expressão e elevadas densidades celulares [100]. Contudo, o processamento a jusante não seguiu esta tendência, e é atualmente considerado o passo limitante na produção de mAbs terapêuticos [101]. Este tipo de processamento depende de interações químicas e físicas, que tornam difícil a seleção de um método genérico, pelo que estes devem ser modelados, testados e desenvolvidos a partir de princípios primários [8]. Os aspetos principais a ter em consideração durante o desenvolvimento de um processo de purificação são a rapidez, o rendimento total e a pureza. Para além disso o processo deve ser detentor de vários critérios de produção, como robustez, confiabilidade e capacidade de aplicação a uma escala industrial [10].

A explosão do número de mAbs que entraram no processo de ensaios clínicos criou a necessidade de aplicar uma abordagem padrão no que respeita à sua purificação [11]. O

processo de purificação de mAbs deve produzir de forma fiável um produto adequado para utilização em humanos, e no qual as impurezas como proteínas da célula hospedeira, ADN, vírus endógenos e adventícios, endotoxinas, agregados e outras espécies sejam removidas, mantendo um rendimento aceitável de anticorpos. Mais ainda, é importante realçar que qualquer tratamento executado durante a purificação exerce *stress* sob a proteína, devido a alterações drásticas nos valores de pH, concentrações de sais ou proteínas, tampões, solventes, bem como nas forças de acasalamento nas interfaces de transmissão e de superfície [102]. Este *stress* pode resultar na desnaturação ou agregação do anticorpo com perdas no rendimento e eficiência de extração, pelo que se torna fundamental a monitorização da qualidade e funcionalidade do produto durante todo o processamento com ferramentas analíticas rápidas e apropriadas. Por tudo isto, o isolamento e purificação do produto final requer numerosas e complexas etapas. Todas estas etapas levam a uma elevada contribuição do processamento a jusante para o seu custo de produção, estimado entre 50-80% do custo total dos mAbs [58]. Deste modo, é essencial criar um processo genérico robusto, com um número limitado de etapas, adequado para todos os mAbs candidatos, reduzindo o tempo e recursos necessários para o desenvolvimento do processo, e que permita atingir os critérios de pureza, qualidade, eficácia e segurança dos anticorpos terapêuticos.

1.6.1. Plataformas estabelecidas

A plataforma atualmente estabelecida para a purificação de mAbs inclui três etapas cromatográficas: numa etapa inicial o mAb é adsorbido a uma resina de afinidade, quase invariavelmente uma coluna de afinidade de proteína A (proA) uma vez que a proA tem uma elevada afinidade para a região Fc do mAb, permitindo a sua captura do sobrenadante das culturas celulares, seguindo-se duas etapas cromatográficas posteriores, as quais permitem a remoção de proteínas das células hospedeiras, ADN, proA que eventualmente se dissocie da coluna, agregados e providenciam ainda um nível adequado de remoção viral total [2]. Na Figura 5 encontra-se representado um esquema geral de uma plataforma típica de processamento a jusante de mAbs, compreendendo as seis etapas fundamentais do processo, nomeadamente a recolha, captura, inativação viral, purificação, remoção viral e concentração por ultrafiltração/diafiltração (UF/DF).

A primeira etapa na recuperação de um anticorpo de uma cultura celular mamífera é a clarificação. Uma vez que os mAbs são tipicamente produzidos em culturas celulares

mamíferas de elevada densidade, é necessária a remoção das células e dos fragmentos celulares do meio de cultura de modo a obter um fluido filtrado e clarificado, adequado para a utilização em cromatografia [11].

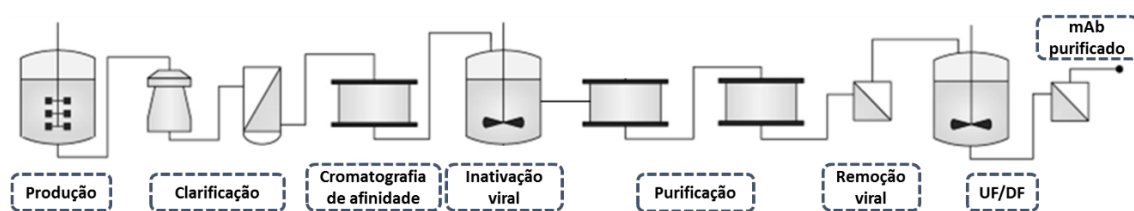


Figura 5 – Plataforma típica de processamento a jusante de mAbs. Os sobrenadantes das culturas celulares resultantes do processo a montante são habitualmente purificados através de um processo de captura por cromatografia proA. De modo a remover todos os contaminantes após esta etapa de captura, e de forma a obter uma pureza final em conformidade com as agências reguladoras, são aplicadas duas etapas adicionais de purificação. Adaptado de Rosa *et al.* [2].

Nos processos habituais, a gama aceitável para a concentração de sólidos no meio de cultura de uma cultura de células mamíferas situa-se usualmente entre os 40-50%, e no final do processo de clarificação, é expectável que a concentração de sólidos seja negligenciável. Esta etapa é normalmente concretizada recorrendo a centrifugação, filtração em profundidade e filtração estéril, embora existam outras abordagens possíveis. No entanto, a centrifugação é preferida em relação a outras tecnologias de clarificação como a microfiltração em fluxo tangencial devido à sua fácil aplicação a uma escala industrial e por se tratar de uma operação económica para grandes volumes (normalmente entre os 2-15,000L por lote) [10]. Estas operações de clarificação constituem, em termos de custos económicos e consumos energéticos, mais de 25% do custo de todo o processamento a jusante [12].

Após uma clarificação bem sucedida, segue-se a etapa de captura do mAb, que na maioria dos processos industriais recorre à cromatografia de afinidade com proA [103]. ProA é um polipéptido com ocorrência natural, que se encontra ancorado à parede da bactéria *Staphylococcus aureus* [104]. A massa molecular da molécula nativa intacta é de 54 kDa, porém é utilizada habitualmente proA recombinante para a purificação de IgG, produzida como uma proteína extracelular excretada na *E. coli*, com uma massa molecular de 42 kDa e desprovida do seu domínio responsável pela ligação à parede celular [12]. A elevada afinidade da proA para a região Fc de anticorpos tipo-IgG está na base da sua purificação e respetivos fragmentos e subclasses [11]. Em particular, a IgG liga-se à proA na junção entre a região constante da cadeia pesada 2 (C_{H2}) e 3 (C_{H3}) [105]. Na Figura 6 é possível verificar uma representação esquemática desta etapa de purificação com cromatografia proA, que envolve, habitualmente, a passagem do sobrenadante da

cultura celular clarificado através da coluna, a pH 6-8, sendo que nestas condições os anticorpos ligam-se à coluna e os componentes não desejados tais como proteínas da célula hospedeira, componentes do meio de cultura e vírus putativos fluem através da coluna, sendo eliminados. Pode ser efetuada um passo intermédio opcional de lavagem, de forma a remover as ligações não específicas das impurezas à coluna. Seguidamente é promovida a eluição do produto através da alteração do pH para 2,5-4 [11]. O mecanismo de ligação IgG-proA consiste em ligações de hidrogénio específicas que são estabelecidas em função do pH. A um pH alcalino, os resíduos de histidina no local de ligação da IgG à proA não se encontram carregados, o que contribui para a ligação. A um pH ácido, esses mesmos resíduos de histidina tornam-se carregados positivamente no mAb e na proA, e como se encontram próximos na área de ligação, repelem-se mutuamente, proporcionando assim um meio fácil para a dissociação da IgG da proA, regenerando a coluna para utilização posterior [12].

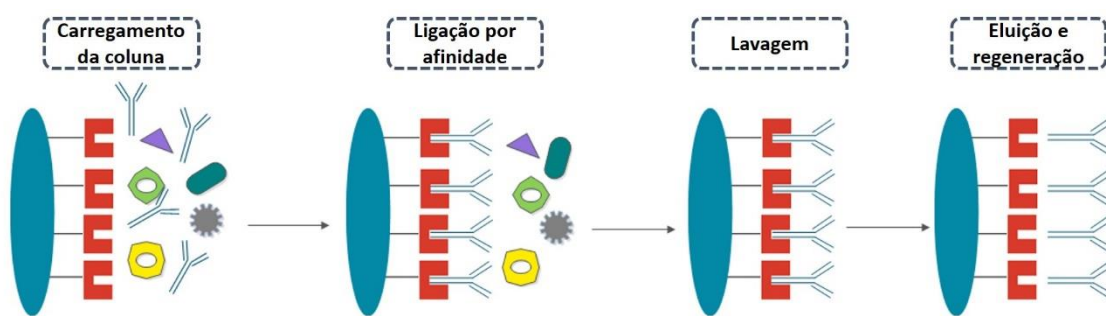


Figura 6 – Representação esquemática de um processo de purificação por cromatografia de afinidade com proA. A proA encontra-se imobilizada na coluna, e após o carregamento da coluna com a amostra, os mAbs são retidos através da ligação por afinidade à proA. Seguidamente, é aplicada uma lavagem à coluna para remover as ligações não específicas, seguindo-se a eluição dos mAbs e regeneração da coluna para posterior utilização. Adaptado de Roque *et al.* [106].

A cromatografia proA está reportada como sendo altamente seletiva para mAbs, resultando em purezas superiores a 99% em um único passo a partir de sobrenadantes de culturas celulares complexos [10]. Assim sendo, a cromatografia proA é amplamente utilizada como primeira etapa de purificação dos anticorpos devido à sua elevada seletividade e elevada capacidade de remoção de impurezas relacionadas com o processo de produção e purificação [11]. Depois desta etapa, os anticorpos encontram-se com uma elevada pureza e mais estáveis devido à eliminação de proteases e outros componentes do meio que podem causar a degradação do produto.

As etapas de purificação e polimento são posteriormente executadas para uma remoção final das impurezas vestigiais da solução [12]. A natureza das etapas subsequentes de purificação é determinada pela natureza do produto e das impurezas presentes, embora

habitualmente, sejam aplicadas duas etapas cromatográficas adicionais de purificação. A maioria dos processos de purificação de mAbs inclui pelo menos um passo de cromatografia de troca iônica, de forma a eliminar os agregados de elevada massa molecular, moléculas carregadas, ADN residual, proteínas da célula hospedeira, proA que eventualmente tenha dissociado da coluna e ainda partículas virais [107]. A utilização de cromatografia de troca aniônica (CTA) é mais comum que a utilização de cromatografia de troca catiónica (CTC), uma vez que a sua resina é mais frequentemente utilizada no modo negativo, no qual o produto não se liga à coluna e as impurezas são retidas [12]. Como já foi anteriormente referido, a utilização de células mamíferas na produção de mAbs pode induzir a produção de retrovírus endógenos devido à integração de genomas virais e ocasionalmente essas mesmas células são infetadas por vírus adventícios durante o processo de produção [12]. Assim, é sempre requerida uma etapa de remoção viral anterior à formulação final do produto. Os produtos obtidos a partir de linhas celulares mamíferas devem conter menos de uma partícula viral por milhão, o que traduz uma remoção de aproximadamente $12-18 \log_{10}$ para retrovírus endógenos e de $6 \log_{10}$ para vírus adventícios [11]. A maioria dos processos de purificação industriais utilizam a inativação a baixo pH, tirando partido do pH ácido utilizado na eluição durante a cromatografia proA, e de uma filtração adicional durante a etapa de purificação [12]. Outras opções de remoção viral incluem a utilização de calor, cromatografia, o uso de solventes/detergentes ou a inativação por radiação ultravioleta [108-110]. Finalmente, o processo de purificação termina quando se coloca o produto num tampão de formulação predefinido, o que é usualmente realizado com uma etapa final de ultrafiltração em modo de diafiltração (UF/DF) [12]. Nesta etapa são utilizadas membranas, tais como polietersulfona ou celulose regenerada que apresentam reduzida ligação às proteínas, e são ainda frequentemente adicionados alguns aditivos, como açúcares ou surfactantes [102].

1.6.2. Processos alternativos

O processamento a jusante nunca teria sido desenvolvido como um setor individual da indústria do bioprocessamento sem a cromatografia, cuja simplicidade e seletividade, tornou-a a chave da tecnologia utilizada em todos os processos de bioseparação [8]. Contudo, a cromatografia apresenta-se como o principal centro de custos do processo, maioritariamente devido ao custo das resinas e das colunas e aos tempos dos ciclos

relativamente longos, pelo que têm sido procuradas novas alternativas com custos associados mais reduzidos [2]. Neste sentido, existem duas opções viáveis a serem consideradas: a substituição da cromatografia proA por outros processos cromatográficos, ou a eliminação da cromatografia através da utilização de métodos não-cromatográficos [8]. Baseado nessa estratégia, têm vindo a ser reportados vários métodos alternativos de purificação de IgG, os quais se encontram resumidos e comparados, em termos de rendimentos e purezas, na Tabela 3.

Tabela 3 – Métodos cromatográficos e não-cromatográficos para a purificação de IgG, comparados em termos de rendimento de extração e de pureza.

Método de purificação	Ligando	Rendimento da IgG (%)	Pureza da IgG (%)	Referência
Métodos Cromatográficos				
3 etapas cromatográficas: CTC, CTA, CIH	-	85	> 99	[111]
CTC	Fosfonato	92-98	95	[112]
CTA com membrana de hidrogel advetivo	-	> 90	> 85	[113]
CIH com membranas compostas de PVDF	-	> 97	> 97	[114]
Cromatografia anular contínua	ProA	77-82	-	[115]
	Hidroxiapatite	87-92	-	[115]
Cromatografia de adsorção em leito expandido	ProA	92	98	[116]
Métodos Não-Cromatográficos				
Eletroforese preparativa	-	80	-	[117]
	-	80-90	-	[118]
Membranas de afinidade	Polissulfona	-	-	[119]
	Celulose regenerada	-	-	[119]
	Ião metálico quelante	90	FP = 33,7	[120]
Precipitação de afinidade	Eudragit S-100	68	FP = 8	[121]
	GAPDH	98	FP = 1,8	[122]
	Hapteno peptídico bivalente	> 85	> 97	[123]
Separação Magnética Não-Cromatográfica	MagPrepProtein A	-	-	[124]
	Nanopartículas magnéticas termo-sensíveis	94	> 98	[125]
	Nanopartículas magnéticas revestidas de amido	69	> 99	[126]

Legenda: CIH – cromatografia de interação hidrofóbica; CTA – cromatografia de troca aniônica; CTC – cromatografia de troca catiónica; FP – fator de purificação; GAPDH – gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; proA – proteína A; PVDF – polivinilidino.

Entre as opções cromatográficas de não-afinidade, a utilização de resinas de troca catiónica para a etapa de captura trata-se de uma alternativa atrativa e promissora dado

que comporta uma matriz cromatográfica uma ordem de magnitude mais barata que a resina de afinidade de proA, permite a remoção de proteínas da célula hospedeira para níveis comparáveis aos do processo tradicional, e pode providenciar capacidades de ligação dinâmica superiores a 100 g/L [11, 12]. Esta alternativa pode ser efetivamente relevante pois a cromatografia proA requer a utilização de um pH ácido durante a eluição, o que pode promover a agregação do produto e a lixiviação de proA da coluna, ao contrário da cromatografia de troca catiónica que não requer um ambiente com baixo pH. Tal como sumariado na Tabela 3, já foi demonstrado o potencial de aplicação de uma plataforma constituída por três etapas cromatográficas para a purificação de IgG, não incluindo a cromatografia proA [111].

Para além disso, têm sido desenvolvidas novas gerações de ligandos, como por exemplo fosfonatos ligados a partículas de Zircônia [112], e destacada a utilização de outras variantes cromatográficas, como a cromatografia de troca catiónica (CTC) [127], a cromatografia de troca aniónica (CTA) [113] e a cromatografia de interação hidrofóbica (CIH) [114]. É, contudo, notório, que a utilização de uma plataforma constituída por 3 etapas cromatográficas (combinando a CTC, CTA e CIH) permite a obtenção de um nível de pureza excecional (> 99%) [111], que não é conseguido por nenhuma das técnicas isoladamente (CTC – 95% [127]; CTA – 85% [113]; CIH – 97% [114]). De um modo geral, e entre as técnicas cromatográficas abordadas, a plataforma de 3 etapas cromatográficas é a estratégia atual mais promissora, pois permite obter elevados rendimentos de extração, com níveis de pureza que permitem atingir os elevados padrões exigidos pela indústria farmacêutica. Por fim, a utilização de cromatografia de afinidade em leito expandido [116] e de cromatografia anular contínua [115] foram também sugeridas como alternativas viáveis para o efeito, embora relativamente a esta última ainda não haja informação referente aos níveis de pureza passíveis de serem obtidos.

Em paralelo, têm vindo a ser desenvolvidas novas tecnologias não-cromatográficas como estratégia alternativas. As principais técnicas utilizadas neste âmbito incluem a eletroforese preparativa [117, 118], filtração por membrana [119, 120], precipitação de afinidade [121-123], separação magnética não-cromatográfica [124-126] e os sistemas aquosos bifásicos [106]. Em geral, a utilização de membranas de afinidade como adsorventes para a purificação de IgG permitem uma boa estabilidade e manutenção dos perfis de adsorção e eluição ao longo de vários ciclos [119]. A eletroforese preparativa aparenta ser também uma alternativa não-cromatográfica promissora, pois para além de permitir extrações aceitáveis de IgG, trata-se de um método que não depende de uma

interação de ligação variável como acontece nas restantes alternativas cromatográficas, permite a sua aplicação a um largo espectro de espécies, apresenta um baixo custo associado e é passível de ser aplicada a uma escala industrial [117, 118]. Por sua vez, recorrendo a partículas magnéticas, é possível separar anticorpos em curtos espaços de tempo, e uma vez que são toleradas partículas em suspensão, não há necessidade de se efetuar nenhuma filtração ou centrifugação anterior ao carregamento da amostra. Finalmente, existe uma tecnologia clássica, bastante estabelecida na indústria farmacêutica, denominada extração líquido-líquido que utiliza solventes orgânicos para o efeito [2]. Contudo, esses solventes orgânicos são na maioria das vezes muito voláteis e tóxicos, e as proteínas, em particular, apresentam baixa solubilidade e elevada propensão para desnaturação na presença destes [128]. Deste modo, a sua utilização em processos biotecnológicos limita-se apenas à recuperação de produtos de baixo peso molecular, tais como antibióticos e ácidos orgânicos de meios de fermentação [129]. Neste sentido, como uma técnica alternativa de extração líquido-líquido, surgem os sistemas aquosos bifásicos (SAB), que têm vindo a demonstrar um enorme potencial e versatilidade para o processamento a jusante de biofármacos, como os anticorpos monoclonais, lipoproteínas de elevada densidade, hormonas, citocinas, fatores de crescimento e ADN plasmídico, tal como revisto por Rosa *et al.* [2].

De todas as técnicas alternativas abordadas neste capítulo, as técnicas não-cromatográficas apresentam-se mais promissoras relativamente às técnicas cromatográficas, uma vez que, de uma forma geral, permitem atingir elevados rendimentos de extração e elevados níveis de pureza, aliados à simplicidade, robustez dos métodos e menor custo energético e/ou económico. De um modo geral, e apesar de nem todos os métodos permitirem atingir os exigentes critérios que a indústria farmacêutica impõe, alguns apresentam um potencial promissor para cumprir esses critérios. Em particular, a plataforma constituída por três etapas cromatográficas [111] permite atingir um elevado grau de pureza (> 99%) de IgG, que é efetivamente o mínimo exigido pela indústria farmacêutica; contudo, a separação magnética constitui um método não-cromatográfico que permite atingir o mesmo nível de pureza dessa plataforma através da utilização de nanopartículas e com apenas uma etapa de extração [126]. Deste modo, a separação magnética revela estar entre as técnicas mais eficientes abordadas, visto que permite bons rendimentos e um nível de pureza adequado para a sua eventual utilização em humanos, para além de que a separação é feita em alguns minutos e sem que sejam necessários pré-tratamentos da amostra, revelando-se assim como uma técnica vantajosa

relativamente à cromatografia proA. No entanto, os SAB são uma alternativa não-cromatográfica ainda mais relevante e com elevado potencial para a purificação de IgG, e serão discutidos mais pormenorizadamente no capítulo 1.7 desta dissertação.

1.7. Sistemas Aquosos Bifásicos (SAB)

No que diz respeito à extração e purificação de biomoléculas ou de outros compostos de valor acrescentado a partir de uma fase líquida, é recorrente a aplicação de métodos de extração do tipo líquido-líquido utilizando solventes orgânicos imiscíveis com água, que por sua vez acarretam inúmeros inconvenientes para o meio ambiente e humano pelo facto de serem voláteis, tóxicos e inflamáveis [130]. Mais ainda, as proteínas apresentam uma baixa solubilidade nestes solventes e uma elevada propensão para desnaturar na sua presença [128]. Neste contexto, surgiu um outro processo que permite a extração de biomoléculas de uma fase líquida para outra, ambas maioritariamente constituídas por água, e designado de sistemas aquosos bifásicos (SAB). No ano de 1896, Beijerinck reportou pela primeira vez a incompatibilidade e formação de duas fases aquosas de soluções de agar com amido ou gelatina solúvel [131]. Contudo, foi apenas no ano de 1955 que os SAB foram reportados como técnica de extração/separação por Albertsson *et al.*, que demonstrou que o polietilenoglicol (PEG), fosfato de potássio e água, assim como PEG, dextrano e água formavam duas fases aquosas imiscíveis [132]. De salientar que ambos os pares de solutos são miscíveis em água e que a formação de SAB ocorre acima de uma determinada concentração dos mesmos [133]. Uma das fases é enriquecida num dos solutos, e na outra fase há prevalência do segundo soluto. Estes solutos podem ser dois polímeros (por exemplo PEG e dextrano), um polímero e um sal (por exemplo PEG e fosfato de sódio) ou outros [133].

As principais vantagens inerentes à utilização dos SAB estão relacionadas com o facto de se tratar de uma técnica relativamente simples, com um baixo custo associado, fácil de operar e de aplicar a uma escala industrial, com uma elevada capacidade de resolução e que permitem que a purificação e concentração sejam integradas numa única etapa [2]. Para além disso, os SAB proporcionam um ambiente altamente biocompatível, uma vez que ambas as fases possuem um elevado teor em água e a maioria dos polímeros utilizados apresentam um efeito estabilizante na estrutura terciária das proteínas e na sua atividade biológica [134]. Os SAB já revelaram ser ferramenta não-cromatográfica eficaz para a separação e purificação de biomoléculas, nomeadamente células, vírus, organelos, ácidos

nucleicos, lípidos, aminoácidos, proteínas, anticorpos e enzimas, tal como revisto por Rosa *et al.* [2].

A partição seletiva de um determinado produto entre as duas fases coexistentes encontra-se na base da separação utilizando um sistema de duas fases [2]. Esta partição é controlada por vários parâmetros relacionados com as propriedades do sistema, do soluto-alvo e das interações entre os dois. No que diz respeito às propriedades do sistema que influenciam a partição, destaca-se a natureza do polímero, o seu peso molecular e concentração, tipo de sal e concentração, pH do sistema e força iónica; relativamente às propriedades do soluto-alvo envolvidas na partição, é possível salientar a carga, peso molecular, hidrofobicidade e características conformacionais. A complexidade das interações químicas e físicas envolvidas no processo de partição torna estes sistemas bastante poderosos em contraste com outras técnicas de separação estabelecidas, uma vez que é possível atingir um elevado poder de resolução apenas através da manipulação das propriedades intrínsecas do sistema [135]. Contudo, toda esta complexidade dos sistemas aliada ao facto de os mecanismos de partição serem ainda pouco compreendidos, prejudicam a previsão da eficácia de um determinado SAB [136].

Cada SAB tem um único diagrama de fases sob um conjunto particular de condições, tais como a temperatura e o pH [134]. Tal como é visível na Figura 7, a curva binodal (A-B-C-D) divide duas regiões: a região monofásica (abaixo da curva), em que a essas concentrações o sistema apresenta-se com apenas uma fase, e a região bifásica (acima da curva), em que a essas concentrações de solutos o sistema forma duas fases aquosas imiscíveis [133]. Nesta figura é ainda possível identificar o ponto M, que corresponde a uma composição de mistura na região bifásica, e cuja composição de cada fase adquire a designação B e D, uma vez que são os pontos terminais de uma *tie-line* (TL) específica. É possível percorrer vários pontos de mistura ao longo dessa mesma TL, diferindo apenas na composição total do sistema e razão volumétrica das fases, mas mantendo a composição exata das duas fases coexistentes (B e D) [134]. O comprimento da *tie-line length* (TLL) é um indicador numérico da diferença da composição entre as duas fases e é geralmente usado para correlacionar tendências na partição dos solutos entre ambas as fases [133].

Um dos polímeros que é habitualmente utilizado na formação de SAB é o PEG [137]. Trata-se de um poliéter diol comercialmente disponível numa larga variedade de pesos moleculares, o que permite a sua adequação ao processo/tipo de sistemas, bem como ao tipo de biomolécula que se pretende extrair [138]. A sua elevada utilização prende-se com

o facto de apresentar características interessantes, nomeadamente uma elevada biodegradabilidade, baixa toxicidade, baixa volatilidade, baixa temperatura de fusão, elevada miscibilidade em água e um baixo custo associado [18].

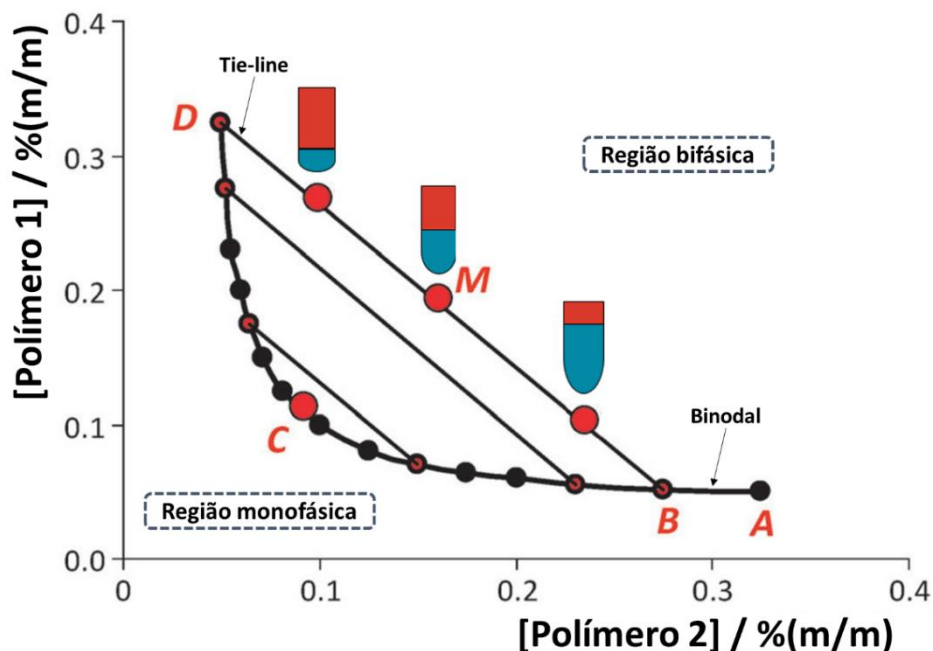


Figura 7 – Representação esquemática de um diagrama de fases hipotético de um sistema constituído por 2 polímeros. A curva binodal encontra-se representada pelos pontos A-B-C-D, e delimita a região monofásica da região bifásica. Os pontos B-M-D representam uma *tie-line*, que para um qualquer ponto de mistura ao longo desta, a composição exata das fases superior e inferior do SAB serão sempre D e B, respetivamente. A razão volumétrica das duas fases coexistentes encontra-se representado graficamente junto de cada ponto da *tie-line*. Adaptado de Freire *et al.* [133].

Mais ainda, o PEG acelera significativamente a renaturação das proteínas, permitindo a recuperação da sua atividade biológica, e apresentando, consequentemente, um papel estabilizante na estrutura das mesmas [139]. Contudo, são comumente utilizados outros polímeros na formação de SAB, como por exemplo o dextrano. Este trata-se de um polímero hidrofílico mais dispendioso quando comparado com o PEG, embora igualmente disponível comercialmente numa vasta variedade de pesos moleculares [2, 140]. No que concerne à separação das fases numa solução contendo uma mistura de polímeros, o fenómeno tem vindo a ser tratado de um ponto de vista mais fundamental através da aplicação de várias teorias que envolvem as propriedades termodinâmicas dos polímeros em solução [134].

O primeiro estudo que sugeriu a utilização de SAB para a purificação de anticorpos foi conduzido por Andrews *et al.*, no ano de 1990, utilizando uma molécula de PEG modificada com proA [141]. Contudo, os custos deste ligando inviabilizaram a abordagem proposta por Andrews e seus colaboradores numa escala mais alargada [141].

Mais tarde, em 1992, Sulk *et al.* propuseram um processo de extração utilizando um SAB constituído por PEG 1540 e fosfato de potássio acoplado à cromatografia de absorção tiofílica [142]. O anticorpo foi recuperado na fase superior, permitindo uma recuperação da IgG de 90% [142]. Em 1996, Andrews *et al.* propuseram um SAB do tipo polímero-sal que permitiu a recuperação de IgG de rato em duas etapas, a partir de sobrenadantes de células de hibridoma [143]. A extração da IgG foi realizada para a fase rica em PEG, num SAB constituído por PEG 1450, com uma baixa concentração de fosfato de potássio e NaCl (14 e 12%, respetivamente), com um rendimento de 90% e um fator de purificação de 2,7. A IgG foi posteriormente re-extraída para uma solução de fosfato de potássio, e os compostos mais hidrofóbicos que se particionaram com a IgG foram então removidos por cromatografia de interação hidrofóbica [143]. Zijlstra *et al.* desenvolveram dois trabalhos de investigação, nos quais acoplaram um corante verde mimético triazina ao PEG, que juntamente com o dextrano formou um SAB que foi então utilizado para extrair a IgG de células de hibridoma para a fase rica em PEG [144, 145]. Mais ainda, Rito-Palomares *et al.* estudaram SAB constituídos por PEG 1000 e fosfato de potássio a pH 9 para o processamento de sangue de bovino numa abordagem compreendendo duas etapas: extração e re-extração [146]. Através desta abordagem, os autores verificaram que as proteínas solúveis como a albumina de soro bovino (BSA), hemoglobina e IgG particionam para a fase superior rica em PEG, enquanto os fragmentos celulares se particionam maioritariamente para a fase inferior rica em sal. Por fim, os autores provaram a reciclagem da fase rica em PEG, através de re-extração da IgG, e até 5 ciclos [146].

Mais recentemente, o grupo de Aires-Barros e seus colaboradores tem vindo a reportar o sucesso da utilização de SAB para a extração de anticorpos de diferentes sobrenadantes de linhas celulares, nomeadamente de células de hibridoma e de células CHO, sendo um dos principais grupos de investigação internacionais a trabalhar nesta área [23, 135, 147-160], e que permite a compilação de uma série de resultados fomentando assim uma comparação mais direta entre a performance de diferentes sistemas. Na Tabela 4 encontra-se um resumo dos principais SAB estudados por Aires-Barros e colaboradores [23, 135, 147-160], nomeadamente o tipo e características de cada sistema, a origem da IgG, os rendimentos de extração e os níveis de pureza associados. Este grupo conseguiu demonstrar o potencial dos SAB para a purificação de anticorpos a partir de matrizes reais, utilizando sistemas PEG/fosfato de potássio [135, 147-150, 160], PEG/citrato de sódio [151, 152], PEG/dextrano [23, 153-157, 159], e UCON/dextrano [158].

Tabela 4 – SAB investigados por Aires-Barros e colaboradores [23, 135, 147-160] para a extração e purificação de IgG, comparados em termos de rendimento de extração e de pureza.

Características do SAB	Origem da IgG	Rendimento de extração da IgG (%)	Pureza da IgG (%)	Ref.
8% PEG 3350 + 10% fosfato de potássio + 15% NaCl, pH 6	MA	76	100	[135]
12% PEG 6000 + 10% fosfato de potássio + 15% NaCl, pH 6	CHO	88	FP = 4,3	[147]
12% PEG 6000 + 10% fosfato de potássio + 15% NaCl, pH 6	HIB	90	FP = 4,1	[147]
8% PEG 3350 + 10% fosfato de potássio + 10% NaCl, pH 6 5 etapas: SAB + 4 etapas de contra-corrente	CHO	89	75	[148]
PEG 3350 + fosfato de potássio Escala piloto de extração contínua com SAB em contra-corrente	CHO	85	50	[149]
10% PEG 3350 + 12% citrato de sódio, pH 6 3 etapas: SAB + CIH + CEM	CHO	90	100	[151]
8% PEG 3350 + 8% citrato de sódio + 15% NaCl, pH 6	HIB	99	76	[152]
PEG 150-AG + dextrano 500000	CHO	93	FP = 1,9	[154]
10% PEG 3350-AG + 5% dextrano 500000 2 etapas: SAB com ligando + CTC	CHO	73	91	[156]
8% PEG 3350-AG + 5% dextrano 500000 + 10mM fosfato de potássio, pH 7	CHO	97	94	[155]
8% UCON 2000 + 6% dextrano 500000 + 20% TEG-AG 2 etapas: extração e re-extração	CHO	85	88	[153]
7% PEG 3350 + 5% dextrano 500000 + 1,3% TEG-AG, pH 4	CHO	96	43	[157]
7% PEG 3350 + 5% dextrano 500000 + 1,3% TEG-AG, pH 4 5 etapas: SAB + 4 etapas de contra-corrente	CHO	95	85	[157]
8% UCON 50HB-3520 + 5% dextrano 500000, pH 5 2 etapas: extração e re-extração	-	82	-	[158]
7% PEG 3350 + 5% dextrano 500000 + 300 mM NaCl, pH 3	HIB	72	-	[23]
7% PEG 6000 + 5% dextrano 500000 + 150 mM NaCl, pH 3	HIB	84	-	[23]
8% PEG 3350 + 5% dextrano 500000 + 200 mM NaCl + partículas revestidas por goma-arábica modificadas com ácido aminofenil borônico	CHO	92	98	[159]
PEG 3350 + fosfato de potássio + NaCl, pH 6 3 etapas: extração, re-extração e lavagem	CHO	80	97	[160]
PEG 3350 + fosfato de potássio + NaCl, pH 6 3 etapas: extração, re-extração e lavagem	PER.C6	100	97	[160]

Legenda: AG – ácido diglutárico; CEM – cromatografia de exclusão molecular; CHO – células de ovário de hamster chinês; CIH – cromatografia de interação hidrofóbica; CTC – cromatografia de troca catiônica; FP – fator de purificação; HIB – células de hibridoma; MA – mistura artificial; PEG – polietileno glicol; TEG-AG – trietileno glicol-ácido diglutárico; UCON – óxido de etileno/óxido de propileno.

Com sistemas constituídos por PEG e fosfato de potássio, os autores simularam um processo de cromatografia em contra-corrente para separar completamente a IgG das restantes impurezas [148]. Para além disso, este tipo de SAB foi já testado numa escala piloto mostrando-se igualmente eficiente [149], e a sua incorporação numa plataforma de microfluídica revelou que a redução à microescala não tem um grande impacto no rendimento de extração, beneficiando contudo de uma redução no tempo de operação [150]. Por motivos associados à utilização de sais de fosfato, Aires-Barros e colaboradores investigaram outras alternativas, nomeadamente SAB constituídos por PEG e citrato de sódio [151, 152]. Esta equipa de investigação passou também “do conceito ao processo” através de uma parceria com os Serviços Tecnológicos da Bayer, sugerindo a utilização de uma bateria de separadores-mistos para efetuar etapas de extração de IgG em série de sobrenadantes de dois tipos de linhas celulares e onde se obtiveram resultados promissores [160].

Os autores demonstraram também que este tipo de sistemas pode ser integrado num processo envolvendo etapas cromatográficas de CIH e cromatografia de exclusão molecular (CEM) [151], e é também possível a aplicação de uma etapa de re-extração/purificação [152]. No sentido de melhorar a especificidade da IgG para a fase rica em PEG, o mesmo grupo de investigação estudou a utilização de PEG funcionalizado com diversos ligandos [154-156] ou incluindo o trietileno glicol-ácido diglutárico (TEG-AG) [153, 157], o que permitiu aumentar a seletividade do sistema para a IgG e obter elevados rendimentos de extração. Incluído na versatilidade das técnicas aplicadas para a purificação de IgG, encontra-se também um processo híbrido que combina a extração através de SAB com a separação magnética [159].

Para que os anticorpos extraídos e purificados sejam aplicados e administrados a humanos é necessário que apresentem um grau de pureza excecional. De acordo com o Código de Regulações Federais da FDA, pureza significa a liberdade relativa de matéria estranha no produto final, não sendo prejudicial para a utilização humana ou prejudicial para o produto [161]. Deste modo, as impurezas devem ser mantidas a níveis mínimos de forma a minimizar os riscos associados, nomeadamente os problemas imunogénicos que possam advir da presença desses mesmos contaminantes. A cromatografia de afinidade com proA permite alcançar purezas de 99% ou superiores [13], e uma vez que se trata do padrão de referência da indústria, serão estes os níveis de pureza que deverão ser alcançados para considerar uma alternativa viável ao processo adotado atualmente. Tal como sumariado na Tabela 4, pela utilização de SAB, os rendimentos de extração

reportados variam entre os 72% e os 99% e os níveis de pureza variam entre os 43% e os 100%. Em particular, os sistemas constituídos por 8% PEG 3350 + 10% fosfato de potássio + 15% NaCl [135] e por 10% PEG 3350 + 12% citrato de sódio [151] são bastante relevantes, pois permitiram obter 100% de pureza de IgG. No entanto, é importante realçar que o primeiro sistema [135] visava a purificação de IgG a partir de uma mistura artificial contendo IgG, albumina e mioglobina (as impurezas proteicas maioritárias presentes nos sobrenadantes de culturas celulares), pelo que se trata de um resultado que não pode ser extrapolado para a realidade, visto que uma matriz real é muito mais complexa. No segundo sistema [151], os 100% de pureza alcançados são resultado de 3 etapas de extração: 1 etapa com SAB e 2 etapas cromatográficas subsequentes (CIH e CEM). Este resultado, quando comparado com o método cromatográfico de 3 etapas [111] apresentado na Tabela 3 do capítulo 1.6.2, que permitiu a recuperação de 85% de IgG com pureza superior a 99%, apresenta-se mais promissor uma vez que reduz uma etapa cromatográfica, permitindo ainda uma maior extração de IgG (90%) com um grau de pureza equiparável. Comparando estes resultados com a utilização isolada de CIH [114], constata-se que não é possível atingir o mesmo nível de pureza, uma vez que os autores demonstraram conseguir apenas 97%, que apesar de se tratar de um nível de pureza elevado, não é capaz de competir com a plataforma estabelecida atualmente. Estes níveis excecionais de pureza não foram demonstrados por mais nenhum sistema dos apresentados na Tabela 4, sendo no entanto possível destacar o sistema constituído por 8% PEG 3350 + 5% dextrano 500000 + 200 mM NaCl + partículas revestidas por goma-arábica modificadas com ácido aminofenil borónico [159], que possibilitou obter IgG com um nível de pureza de 98%, que embora não seja suficiente para a indústria farmacêutica, aparenta ser um sistema interessante e que merece ser explorado em mais detalhe uma vez que essa pureza foi obtida com uma única etapa.

Um outro grupo de investigação que trabalha mais diretamente dentro da área de pesquisa da purificação de anticorpos monoclonais utilizando SAB é o grupo de Platis e Laubrou em Atenas, que estudam plantas transgênicas, nomeadamente a planta do tabaco [162-164]. A planta do tabaco apresenta o mesmo padrão de glicosilação que os humanos, pelo que se torna possível a produção de anticorpos monoclonais humanizados através desta planta. Os principais benefícios prendem-se com os reduzidos custos de produção e o baixo risco de contaminação humano, uma vez que têm origem vegetal. Os SAB revelaram-se assim, um sistema benéfico para a purificação de proteínas de plantas, que de outra maneira teria que recorrer a várias etapas cromatográficas, nomeadamente

cromatografia de troca iônica, exclusão molecular e cromatografia de afinidade [163]. Os autores estudaram sistemas constituídos por PEG 1500 e fosfato de potássio, que lhes permitiu a remoção dos metabolitos secundários potencialmente perigosos da planta do tabaco [162]. Mais ainda, foi possível acoplar este método de purificação, vital para a remoção de polifenóis, com a cromatografia de troca catiônica e cromatografia de afinidade metálica, aumentando os níveis de purificação [163], havendo já evidências reportadas da partição dos mAbs e dos fragmentos celulares das plantas para fases opostas [164]. Os mAbs purificados foram sempre analisados por eletroforese de proteínas, ELISA e *western blot*, demonstrando a atividade dos mAbs e a sua pureza no que diz respeito a variantes degradadas, polifenóis e alcaloides [162-164].

Outros investigadores também sugeriram, mais recentemente, novos métodos de separação e purificação de IgG a partir de diversas matrizes. É possível destacar as investigações de Hye-Mee Park *et al.*, que sugeriram um novo método de separação por afinidade, no qual a peroxidase do rábano (HRP) associada à IgG humana foi utilizada como ligando de afinidade [165]. Vargas *et al.* também reportaram um novo método de fracionamento de plasma utilizando PEG 3350, fosfato de potássio e NaCl a pH 6,1 [166] e já no ano de 2015, aplicaram com sucesso a metodologia dos SAB como etapa primária de purificação de IgG de cavalo anti soro antiofídico [167]. Wu *et al.* constataram que o sistema constituído por PEG 4000, hidroxipropil amido (HPS) e NaCl a pH 8 constitui também uma alternativa promissora para a recuperação primária de IgG a partir de uma matriz complexa [168]. Também no ano de 2015, Muendges *et al.* publicaram dois trabalhos referentes à extração e purificação de IgG provenientes de linhas celulares obtidas de CHO, utilizando um sistema PEG 2000 e fosfato de sódio/potássio a pH 6 [169, 170].

Em suma, foram atingidos alguns resultados promissores na purificação de IgG proveniente de diversas matrizes complexas, nomeadamente de matrizes biológicas como o sangue de bovino, ou de sobrenadantes de linhas celulares desenvolvidas a partir de CHO e hibridoma. As diferenças obtidas entre os vários estudos apresentados resultam da alteração dos componentes do SAB, das suas concentrações, pH, da existência ou não de um ligando, da adição de eletrólitos e do recurso a etapas adicionais de purificação. Torna-se assim importante referir que a necessidade de recorrer a etapas adicionais de extração/purificação tornam o processo mais complexo e dispendioso. A exploração de ligandos de afinidade e de eletrólitos é bastante importante pois permitiu melhorar a seletividade dos SAB estudados e apresentados na Tabela 4, dado que os SAB

convencionais polímero/polímero e polímero/sal apresentam uma gama de polaridade restrita. Um dos componentes comum a todos os trabalhos é o PEG, que possivelmente, pelas suas características de biocompatibilidade anteriormente discutidas, seja amplamente utilizado pela comunidade científica a trabalhar nesta área. Assim sendo, torna-se evidente que o estudo de novos sistemas visando a extração seletiva e consequente purificação de IgG deve ser feito através da manipulação de alguns dos restantes parâmetros referidos, onde a utilização de diferentes eletrólitos tem um papel primordial.

Em termos dos custos associados ao processo, Rosa *et al.* publicaram um estudo comparando diretamente a purificação de mAbs através de SAB e de cromatografia proA [171]. Através deste estudo, os autores demonstraram que com a utilização de SAB, os custos associados à purificação podiam ser reduzidos em pelo menos 39%. Contudo, através das evidências bibliográficas aqui apresentadas é possível concluir que, em quase todas as investigações reportadas, são requeridas etapas adicionais de cromatografia, a utilização de ligandos ou de polímeros funcionalizados, ou mesmo várias etapas de extração com SAB. Todos estes artefactos/etapas adicionais tornam o processo mais complexo e dispendioso, pelo que é extremamente relevante criar novos avanços nesta área que apresenta tão elevado potencial para o mercado biofarmacêutico.

1.7.1. Líquidos Iónicos (LIs) como constituintes de SAB

Embora o PEG seja um dos componentes mais utilizados na formação de SAB e apesar de todas vantagens inerentes à sua utilização, devido à sua natureza hidrofílica, verifica-se uma limitação na aplicação desta técnica na extração de biomoléculas hidrofóbicas ou na separação de biomoléculas com polaridades semelhantes [172]. No sentido de colmatar esta situação, os investigadores começaram a estudar novas abordagens, destacando-se o trabalho de Rosa *et al.* e Azevedo *et al.* que recorreram à funcionalização do PEG [135, 155]. Uma nova abordagem para os SAB foi originalmente proposta por Rogers *et al.*, no ano de 2003, que consiste na utilização de líquidos iónicos (LIs) e sais inorgânicos como uma alternativa aos sistemas convencionais formados por polímeros [173].

Os LIs são sais que, ao contrário dos eletrólitos comuns, são líquidos a temperaturas inferiores a 100°C, e devido à sua natureza iónica, apresentam algumas propriedades importantes: possuem volatilidade negligenciável, não são inflamáveis, possuem elevada condutividade iónica, elevada estabilidade térmica, elevada estabilidade eletroquímica e

uma baixa viscosidade [174]. Em particular, a sua baixa volatilidade e o facto de serem inflamáveis contribuíram para a sua designação de “*green solvents*”. No que concerne à sua constituição, estes são normalmente compostos por um catião orgânico assimétrico de elevadas dimensões, e por um anião de natureza orgânica ou inorgânica com dimensões mais reduzidas. Através de uma manipulação apropriada do catião e do anião que constituem o LI, é possível obter inúmeras combinações de LIs, abrangendo deste modo, um espectro mais alargado de polaridades, razão pela qual estes solventes são também designados como “*designer solvents*”. Ao contrário dos solventes moleculares tradicionais, os LIs podem ser vistos como um meio nano-segregado, composto por uma rede polar permeada por domínios não-polares [175]. Estes domínios permitem aos LIs interagir seletivamente com diferentes tipos de solutos/solventes, podendo sempre ser previstas propriedades e aplicações melhoradas. Neste sentido, os LIs podem ser seleccionados de modo que não conduzam a alterações da estrutura das proteínas [176].

A principal vantagem dos SAB constituídos por LIs relaciona-se com a possibilidade de manipular a polaridade das fases coexistentes através de uma escolha apropriada dos iões que constituem o LI [133]. Através da introdução de LIs torna-se possível ultrapassar a gama de polaridade limitada dos SAB derivados de polímeros, em que as diferenças de polaridade dependem essencialmente da quantidade de água presente em cada fase. Os SAB constituídos por LIs já demonstraram uma elevada performance, através da obtenção de extrações completas num único passo [177], elevada seletividade para uma determinada molécula-alvo em matrizes complexas [178], ou através da utilização de LIs de natureza biocompatível capazes de manter a estrutura das proteínas [176]. Com base na possibilidade de obter uma gama mais alargada de polaridades dos SAB, duas equipas de investigadores reportaram a síntese de PEGs funcionalizados com LIs de modo a aumentar a seletividade dos sistemas [179, 180]. Para além disso, já foi também demonstrado que a adição de pequenas quantidades de LIs aos SAB convencionais constituídos por um polímero e um sal inorgânico rege maioritariamente o comportamento de partição das biomoléculas [14, 172, 181-183]. Pereira *et al.* demonstraram que a partição do L-triptofano é dominada pelo LI utilizado como adjuvante, a apenas 5% (m/m), o que permitiu atingir coeficientes de partição superiores a 25 [172]. Mais ainda, constataram que o comportamento de partição é altamente dependente do LI utilizado, sendo que o seu catião apresentava o papel principal no controlo da capacidade de extração da biomolécula para a fase rica em PEG, e que a temperatura nestes sistemas com LIs como adjuvantes influenciava significativamente a

eficiência de extração do L-triptofano, reiterando resultados previamente sugeridos por Pei *et al.* relativamente às proteínas [184]. Em particular, Hamzehzadeh *et al.* investigaram também o potencial do LI brometo de 1-butil-3-metilimidazólio, utilizado como adjuvante a 5% (m/m) em SAB constituídos por $K_3C_6H_5O_7$ e por PEG de diferentes pesos moleculares ($400\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ [181] e $600\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ [183]) para a extração de L-triptofano. Em ambos os estudos, os resultados demonstraram que a adição de apenas pequenas quantidades de LI permitem melhorar consideravelmente os coeficientes de partição da biomolécula para a fase rica em polímero. No mesmo sentido, Almeida *et al.* utilizaram SAB constituídos por PEG e Na_2SO_4 , com LIs como adjuvantes, e avaliaram a sua performance na extração de antioxidantes [14]. Os autores demonstraram que a manipulação da estrutura química do LI é determinante para a obtenção de elevadas eficiências de extração (compreendidas entre 80% e 99%). Mais recentemente, de Souza *et al.* investigaram o impacto de vários LIs na formação de SAB igualmente constituídos por PEG e um sal inorgânico, demonstrando elevados coeficientes de partição do ácido clorânico e rodamina 6G para a fase rica em PEG na presença de LI [182]. Deste modo, é possível concluir que a utilização de LIs, mesmo que como adjuvantes e/ou em pequenas quantidades, permite efetivamente ajustar as polaridades e afinidades de ambas as fases de SAB, permitindo assim a manipulação da partição das (bio)moléculas-alvo. Deste modo, e embora ainda não existam trabalhos publicados utilizando LIs em SAB para a extração de IgG, é possível prever que os LIs são uma alternativa interessante aos eletrólitos mais convencionais com potencial elevado para aplicação em SAB para a purificação de IgG.

1.8. Motivação e objetivo da dissertação

De um modo geral, e através da revisão da literatura efetuada, é possível concluir que os SAB são uma alternativa não-cromatográfica com grande potencial face a todos os métodos de purificação abordados para a IgG a partir de sobrenadantes de culturas celulares. Os SAB apresentam elevada biocompatibilidade, facilidade de aplicação à escala industrial com um baixo custo associado, elevada produtividade e elevada estabilidade química e proteolítica. É também possível perspetivar a utilização de LIs como componentes dos SAB, aliando a esta técnica uma melhoria considerável em termos de seletividade devido à possibilidade de manipulação da polaridade das fases coexistentes. Face ao exposto, nesta tese pretendeu-se produzir anticorpos humanizados

através de linhas celulares obtidas a partir de CHO e avaliar a utilização de SAB, do tipo polímero/sal e polímero/polímero com LIs como adjuvantes, na extração seletiva de IgG e posterior purificação diretamente a partir de sobrenadantes de linhas celulares obtidas de CHO. Para tal, inicialmente foi efetuado um estudo inicial sobre a influência de diversos LIs no comportamento de partição da IgG pura/comercial, seguido da aplicação dos SAB mais promissores estudados para a extração e purificação da IgG a partir dos sobrenadantes das culturas de células CHO. A eficiência do processo de extração foi inferida e discutida de acordo com os rendimentos de extração e níveis de pureza obtidos, bem como do ponto de vista da manutenção da integridade, das propriedades físico-químicas e da estabilidade estrutural da proteína.

2. Materiais e Métodos

2.1. Produção de anticorpos monoclonais anti-IL-8

2.1.1. Linha celular e meio de cultura

Os anticorpos monoclonais anti-interleucina-8 humana (anti-IL-8) foram produzidos por uma linha celular CHO DP-12 clone #1934 (ATCC CRL-12445) da *American Tissue Cell Collection* (ATCC), utilizando o método de seleção DHFR⁻/metotrexato. De acordo com a patente americana #6133426 (patente europeia EP 1415998), trata-se de um clone derivado da transfeção de células CHO DP-12 com o vetor p6G4V11N35E.choSD.10 e selecionadas em metotrexato.

As células CHO DP-12 cresceram em 75% (v/v) de meio de cultura sem soro (ProCHOTM5, Lonza Group Ltd, Bélgica) e 25% (v/v) DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Gibco[®], Carlsbad, CA, EUA) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino com teor muito baixo em IgG (FBSUL, Gibco[®]). 200 nM de metotrexato encontrava-se presente no meio de cultura de forma a manter a pressão seletiva. ProCHOTM5 foi suplementado com 4 mM L-glutamina (Gibco[®]), 2,1 g/L NaHCO₃ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), 10 mg/L insulina humana recombinante (Lonza), 0,07% (v/v) lípidos (Lonza) e 1% (v/v) antibióticos (100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina) (Gibco[®]). O meio de cultura DMEM utilizado continha 4,5 g/L D-glucose, 4 mM L-glutamina e 1 mM de piruvato de sódio. Após a ressuspensão do pó de DMEM, adicionou-se 1,5 g/L NaHCO₃, 2 mg/L insulina recombinante humana, 35 mg/L L-prolina (todos adquiridos através da Sigma-Aldrich), 0,1% (v/v) de um elemento vestigial A, 0,1% (v/v) de um elemento vestigial B (ambos da Cellgro[®], Manassas, VA, EUA) e 1% (v/v) antibióticos (100 U/mL penicilina e 100 µg/mL streptomicina) (Gibco[®]).

2.1.2. Passagem celular

As culturas cresceram em frascos T-75 (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ) a 37 °C (± 1 °C) e 5% CO₂, com uma densidade celular inicial de $2,1 \times 10^6$ células/mL. As passagens celulares foram realizadas a cada 4 dias, em condições de máxima assepsia numa câmara de fluxo laminar. Em cada passagem, os sobrenadantes celulares foram coletados para

tubos BD Falcon™ e sujeitos a centrifugação a 1250 rpm durante 7 minutos, período após o qual foram transferidos para um novo tubo BD Falcon™ e armazenados a -20 °C (± 1 °C). As células foram lavadas com uma solução salina aquosa tamponizada a pH 7,4 designada PBS (*Phosphate Buffer Saline*) (Gibco®) e dissociadas do frasco T-75 pela adição de uma solução de Acutase (Sigma-Aldrich) por 5 minutos a 37 °C (± 1 °C). A suspensão celular foi centrifugada a 1250 rpm durante um período de 7 minutos num tubo BD Falcon™, e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi ressuspendido em novo meio de cultura, sendo retirada uma alíquota para o processo de contagem celular e determinação da viabilidade. Assim, o número de células presentes na cultura após os 4 dias de crescimento foi determinado através de um hemacitômetro e utilizando um microscópio ótico Leica DMLB (Wetzlar, Alemanha), através do método de exclusão do azul de tripano (Gibco®). A suspensão celular foi posteriormente cultivada num novo frasco T-75, numa densidade celular de $2,1 \times 10^6$ células/mL, sendo então transferido para uma incubadora a 37 °C (± 1 °C) e 5% de CO₂.

A evolução da morfologia das células ao longo dos 4 dias de cultura foi visualizada num microscópio Olympus CKX41 (Tóquio, Japão) e as imagens digitais foram adquiridas através do *software* CellSens Entry (Tóquio, Japão) e tratadas com o *software* de tratamento de imagem ImageJ.

A cultura celular foi mantida por vários meses, sendo que em cada passagem vários parâmetros foram determinados, nomeadamente a densidade celular (Equação 1), percentagem de viabilidade (Equação 2) e a produtividade (Equação 3):

$$DC = N^{\circ} \text{ células vivas} \times FD \times 10^4 \quad (1)$$

$$\% \text{ viabilidade} = \frac{N^{\circ} \text{ células vivas}}{N^{\circ} \text{ células total}} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Produtividade} = \frac{[IgG]}{N^{\circ} \text{ células total} \times t} \quad (3)$$

em que *DC* representa a densidade celular, *FD* refere-se ao fator de diluição em causa, *t* representa o tempo de cultura, expresso em dias e *[IgG]* representa a concentração de IgG presente no sobrenadante celular, expressa em mg/L. Por fim, o pH de cada sobrenadante foi determinado a 25 °C (± 1 °C) utilizando um medidor METTLER TOLEDO SevenMulti pH (Vantaa, Finlândia), com uma incerteza de $\pm 0,002$ em cada medição.

2.2. Sistemas quaternários PEG + Fosfato + H₂O + LI

2.2.1. Reagentes químicos

Os sistemas utilizados neste trabalho foram estabelecidos através da utilização de uma solução aquosa de PEG com uma massa molecular de 3350 Da, abreviado como PEG 3350, e obtido através da Sigma-Aldrich. O polímero foi utilizado sem qualquer purificação posterior.

A fase aquosa consistiu numa solução de tampão fosfato a pH 7, preparada a partir de fosfato de potássio dibásico anidro (K₂HPO₄) e fosfato de sódio monobásico anidro (NaH₂PO₄), obtidos igualmente a partir da Sigma-Aldrich, uma vez que estes apresentam maior solubilidade do que os seus respetivos sais monobásicos e dibásicos.

Nesta etapa foram estudados dois LIs como adjuvantes no sistema: o cloreto de tetrametilamónio, [N₁₁₁₁]⁺Cl⁻; e o cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio, [C₄mim]⁺Cl⁻. Os LIs foram fornecidos pela Sigma-Aldrich e pela Iolitec (Heilbronn, Alemanha), respetivamente. As estruturas químicas dos LIs estudados encontram-se representadas na Figura 8.

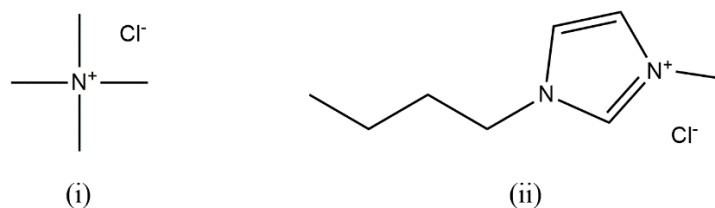


Figura 8 – Estruturas químicas dos LIs estudados como adjuvantes no sistemas PEG+Fosfato+H₂O: (i) [N₁₁₁₁]⁺Cl⁻; (ii) [C₄mim]⁺Cl⁻.

De forma a reduzir a água e o conteúdo de compostos voláteis para valores negligenciáveis, as amostras individuais de LIs foram secas perante agitação constante em vácuo e a uma temperatura moderada de aproximadamente 50 °C (± 1 °C), por pelo menos 24 horas. Após este processo, a pureza de cada LI foi averiguada pelo espetro de RMN de ¹H e ¹³C e verificou-se estar de acordo com a pureza indicada pelos fornecedores.

A água utilizada ao longo de todo este trabalho foi tratada com o sistema de purificação de água Milli-Q[®] Integral (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha).

2.2.2. Reagentes biológicos

Para os estudos do potencial de extração e otimização destes sistemas foi utilizada IgG humana para administração terapêutica (nome comercial: Gammanorm[®]), adquirida

através da Octapharma (Lachen, Suíça), como uma solução de concentração 165 mg/mL contendo 95% de IgG (dos quais 59% IgG1, 36% IgG2, 4,9% IgG3 e 0,5% IgG4).

2.2.3. Procedimento experimental para a extração de IgG comercial

2.2.3.1. Preparação dos SAB

Inicialmente, foi necessária a preparação da solução *stock* de IgG comercial a uma concentração de 1 mg/mL, a partir da solução de IgG Gammanorm® de concentração 165 mg/mL, para posterior utilização na formação de cada SAB.

A composição das misturas quarternárias foi escolhida com base no diagrama de fase ternário do sistema PEG 3350 + Fosfato + H₂O já reportado na literatura [132]. Deste modo, SAB com uma massa final de 2 g foram preparados em eppendorfs através da pesagem das quantidades apropriadas dos componentes a partir de soluções *stock* de 50% (m/m) PEG 3350 e 40% (m/m) tampão fosfato (preparado através da adição de 16 g de NaH₂PO₄, 24 g de K₂HPO₄ e 60 g de H₂O). A concentração de PEG e fosfato no sistema foi de 12% e 10%, respetivamente, tendo sido estudadas diferentes concentrações de cada LI (nomeadamente 1, 5 e 10%). A solução *stock* de IgG representou 30% da massa do sistema, exceto nos brancos em que não foi adicionada qualquer quantidade de IgG. Finalmente, a água foi adicionada de modo a atingir a composição final desejada para o sistema. Assim, as misturas foram preparadas gravimetricamente, com um erro associado de $\pm 10^{-6}$ g, e vigorosamente agitadas com auxílio de um vórtex (Ika, Staufen, Alemanha). De forma a ser atingido o equilíbrio e garantindo a completa separação das fases, os sistemas foram centrifugados a 3500 rpm. durante um período de 30 minutos (período de tempo estabelecido em trabalhos de otimização prévios), numa centrífuga com rotor de ângulo fixo (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), permitindo o particionamento completo da IgG entre as duas fases coexistentes.

Em todas as misturas consideradas para este tipo de sistema e com as composições utilizadas, a fase aquosa rica em PEG é a fase superior, ao passo que a fase aquosa rica em fosfato corresponde à fase inferior.

Seguidamente, os volumes foram determinados e as fases devidamente separadas, utilizando uma micropipeta para a remoção das fases superiores e uma seringa de 2 mL para a obtenção da fase inferior. Ambas as fases foram posteriormente analisadas, tendo sido quantificada a proteína presente em cada fase, e o coeficiente de partição, o

rendimento e eficiência de extração e os respectivos desvios-padrão foram ainda determinados.

2.2.3.2. Determinação do pH das fases

O pH de ambas as fases coexistentes, a fase aquosa rica em PEG e a fase aquosa rica em fosfato, foi determinado a 25 °C (± 1 °C) utilizando um medidor Metrohm 702 SM Titrino (Herisau, Suíça), com uma incerteza de $\pm 0,01$ em cada medição.

2.2.3.3. Quantificação de IgG

O conteúdo de IgG presente em cada fase foi quantificado através de cromatografia de afinidade num sistema ÄKTA™ 10 Purifier da GE Healthcare (Uppsala, Suécia) utilizando uma coluna de afinidade analítica POROS Proteína G ($2,1 \times 30$ mm) da Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA). A adsorção da IgG à coluna foi realizada com um tampão fosfato a pH 7,4 contendo 50 mM de fosfato de sódio (NaH_2PO_4) e 150 mM de cloreto de sódio (NaCl) durante 1,8 minutos. A eluição do anticorpo foi conseguida através da diminuição do valor de pH, utilizando um tampão a pH 2 contendo 12 mM de ácido clorídrico (HCl) e 150 mM de NaCl durante um período de 2,5 minutos. Finalmente, a coluna foi reequilibrada com o tampão de adsorção durante 3,4 minutos. As amostras das fases superiores e inferiores contendo IgG foram diluídas 20 vezes no tampão de adsorção e foram injetados 0,5 mL na coluna utilizando o Autosampler A-900 da GE Healthcare. A absorvância foi monitorizada a 215 nm. A concentração de IgG foi posteriormente determinada a partir de uma curva de calibração preparada de fresco a cada ensaio de quantificação, e obtida utilizando IgG Gammanorm como biomolécula-padrão. Os padrões de IgG preparados variaram numa gama de concentrações compreendidas entre 0,2 e 20 mg/L, tal como é possível observar na Figura B.1 do Anexo B, que representa o exemplo de uma curva de calibração obtida utilizando este procedimento. No final de cada ensaio, a coluna foi armazenada num tampão fosfato a pH 7,4 contendo 10 mM de NaH_2PO_4 , e 0,002% de azida de sódio.

2.2.3.4. Determinação dos coeficientes de partição e rendimentos/eficiências de extração da IgG

Os coeficientes de partição da proteína, K_{IgG} , foram determinados de acordo com a Equação 4,

$$K_{IgG} = \frac{[IgG]_{PEG}}{[IgG]_{fosfato}} \quad (4)$$

em que $[IgG]_{PEG}$ e $[IgG]_{fosfato}$ representam a concentração total da IgG na fase aquosa rica em PEG e em fosfato, respetivamente. O rendimento de extração de IgG para a fase rica em PEG foi determinado através da Equação 5, abaixo mencionada,

$$\%Y_{IgG} = \frac{[IgG]_{PEG} \times V_{PEG}}{[IgG]_{inicial} \times V_{inicial}} \times 100 \quad (5)$$

em que $[IgG]_{PEG}$ representa a concentração de IgG na fase aquosa rica em PEG, $[IgG]_{inicial}$ representa a concentração de IgG adicionada inicialmente a partir do *stock* para a formação do sistema, e os parâmetros V_{PEG} e $V_{inicial}$ representam o volume da fase aquosa rica em PEG e o volume da solução de IgG adicionada ao sistema, respetivamente. A eficiência de extração foi determinada através da Equação 6

$$\%EE_{IgG} = \frac{[IgG]_{PEG} \times V_{PEG}}{[IgG]_{PEG} \times V_{PEG} + [IgG]_{fosfato} \times V_{fosfato}} \times 100 \quad (6)$$

em que $[IgG]_{PEG}$ e $[IgG]_{fosfato}$ representam a concentração de proteína na fase aquosa rica em PEG e fosfato, respetivamente, e os parâmetros V_{PEG} e $V_{fosfato}$ representam o volume da fase aquosa rica em PEG e em fosfato, respetivamente. Possíveis interferências do tampão fosfato, do PEG 3350 e dos vários LIs com os métodos analíticos foram investigadas e não aparentaram ser consideráveis nas condições em que se realizou o trabalho e diluições efetuadas.

2.3. Sistemas quaternários PEG + Dextrano + H₂O + LI

2.3.1. Reagentes químicos

Os sistemas utilizados neste trabalho foram estabelecidos através da utilização de uma solução aquosa de PEG com uma massa molecular de 3350 Da, abreviado como PEG 3350, e de uma solução de dextrano com uma massa molecular de 500.000 Da, abreviado como dextrano 500 kDa, ambos obtidos através da Sigma-Aldrich. Os polímeros foram utilizados sem qualquer purificação posterior.

Foram estudados nove LIs como adjuvantes no sistema, nomeadamente: o cloreto de tetrametilamónio, $[N_{1111}]\text{Cl}$ (pureza superior a 97%); o cloreto de tetrabutilamónio, $[N_{4444}]\text{Cl}$ (pureza superior a 97%); o cloreto de tetrabutílfosfónio, $[P_{4444}]\text{Cl}$ (sem informação relativamente à pureza); o cloreto de 1-butil-4-metilpiridínio, $[C_4\text{-4mpy}]\text{Cl}$ (pureza superior a 98%); o cloreto de colina, $[\text{Ch}]\text{Cl}$ (pureza superior a 98%); o acetato

de colina, [Ch][Ac] (pureza superior a 99%); o cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio, [C₄mim]Cl (pureza superior a 99%); o brometo de 1-butil-3-metilimidazólio, [C₄mim]Br (pureza superior a 99%); e o hidrogenosulfato de 1-butil-3-metilimidazólio, [C₄mim][HSO₄] (pureza superior a 99%). Os LIs foram fornecidos pela Iolitec, à exceção do [N₁₁₁₁]Cl e do [N₄₄₄₄]Cl que foram fornecidos pela Sigma-Aldrich, o [Ch]Cl fornecido pela Acros Organics e o [P₄₄₄₄]Cl providenciado pela Cytec Industries Inc. As estruturas químicas dos LIs estudados encontram-se representadas na Figura 9.

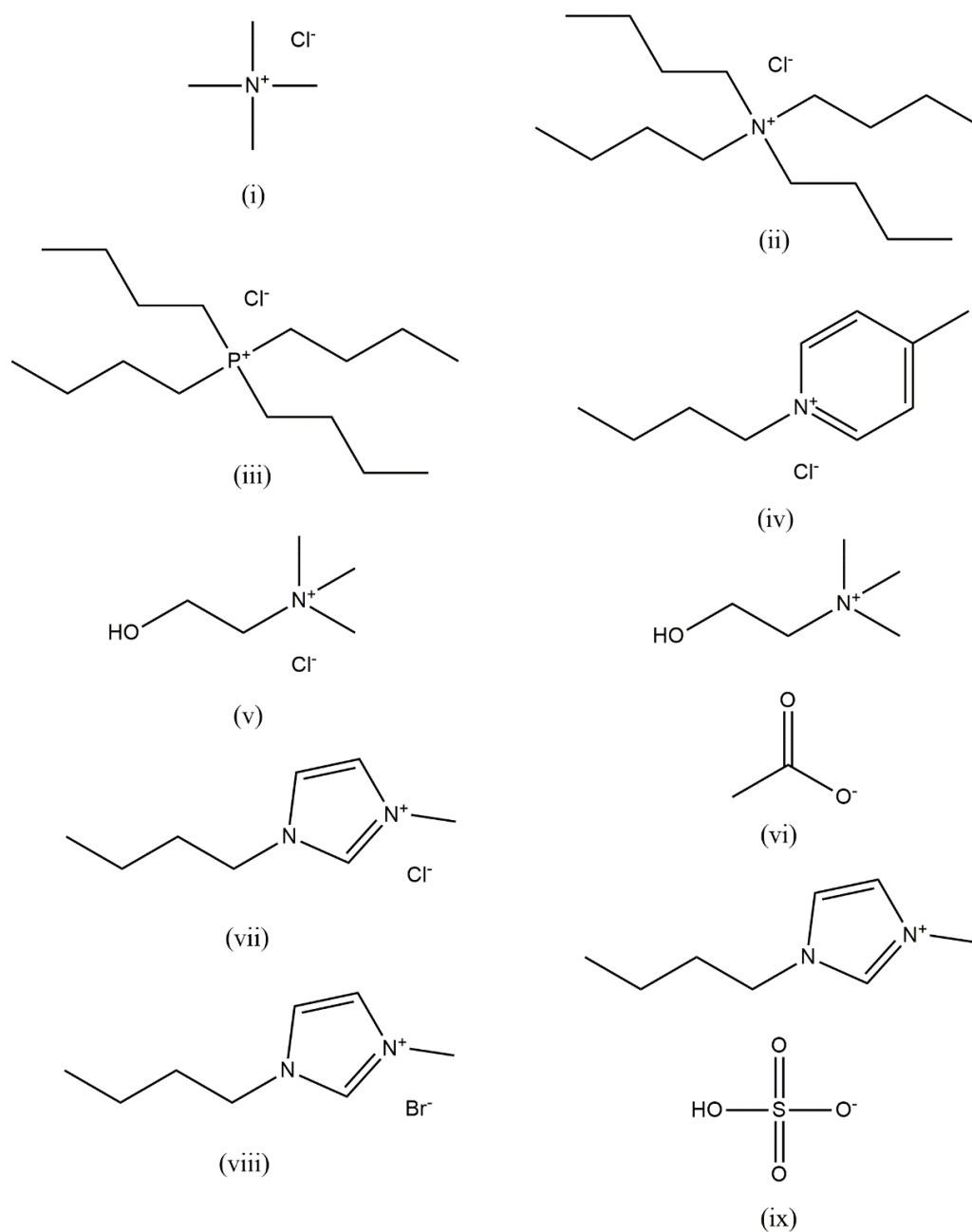


Figura 9 – Estruturas químicas dos LIs estudados como adjuvantes nos sistemas PEG+Dextrano+H₂O: (i) [N₁₁₁₁]Cl; (ii) [N₄₄₄₄]Cl; (iii) [P₄₄₄₄]Cl; (iv) [C₄-4mpy]Cl; (v) [Ch]Cl; (vi) [Ch][Ac]; (vii) [C₄mim]Cl; (viii) [C₄mim]Br; (ix) [C₄mim][HSO₄].

De forma a reduzir a água e o conteúdo de compostos voláteis para valores negligenciáveis, as amostras individuais de LIs foram secas perante agitação constante em vácuo e a uma temperatura moderada de aproximadamente 50 °C (± 1 °C), por pelo menos 24 horas. Após este processo, a pureza de cada LI foi averiguada pelo espectro de RMN de ^1H e ^{13}C e verificou-se estar de acordo com a pureza indicada pelos fornecedores.

O material necessário para a análise por SDS-PAGE inclui: solução de acrilamida/bisacrilamida 40% obtida a partir da Bio-Rad (Hercules, CA, EUA); tris(hidroximetil)aminometano, PA da Pronalab; dodecilsulfato de sódio, SDS, com pureza superior a 98,5% (m/m) e glicina obtidos na Sigma-Aldrich; persulfato de amónio (APS) e N,N,N',N'tetrametiletenodiamina (TEMED) igualmente obtidos na Sigma-Aldrich; 4x Laemmli Sample Buffer adquirido na Bio-Rad (Hercules, CA, EUA); solução de DL-ditiotreitol 1M em água, DTT, obtido na Sigma-Aldrich; azul brilhante de Coomassie R sob a forma de pastilhas solúveis (nome comercial: PhastGel[®] Blue R) adquirido na Sigma-Aldrich; etanol da Thermo Scientific Pierce (Rockford, IL, EUA); ácido acético (CH_3COOH) 100% puro glacial obtido na Merck; marcador *Precision Plus Protein[™] Dual Color Standards* foram adquiridos na Bio-Rad (Hercules, CA, EUA).

Para a quantificação das proteínas totais pelo método de Bradford, o Coomassie Plus (Bradford) Protein Assay foi adquirido na Thermo Scientific Pierce.

2.3.2. Reagentes biológicos

Para os estudos do potencial de extração e otimização destes sistemas foi utilizada IgG humana para administração terapêutica (nome comercial: Gammanorm[®]), adquirida através da Octapharma, com as especificações anteriormente descritas.

A realização dos estudos da potencialidade de extração e purificação dos sistemas em estudo a partir da matriz real foi feita utilizando os sobrenadantes das culturas celulares CHO DP-12, produzidos de acordo com o procedimento descrito no capítulo 2.1. desta dissertação, tratando-se de uma matriz extremamente complexa contendo anticorpos anti-IL-8.

O padrão de albumina de soro bovino (BSA) foi adquirido em ampolas, com uma concentração de 2 mg/mL, através da Thermo Scientific Pierce.

2.3.3. Procedimento experimental para a caracterização do sistema

2.3.3.1. Determinação do diagrama de fase

Inicialmente, a curva binodal do diagrama de fase do sistema ternário PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H₂O foi determinado, pois apesar de este já se encontrar reportado na literatura [132], pretendeu-se caracterizá-lo nas condições exatas de trabalho (por exemplo em termos de temperatura e pureza dos componentes utilizados). Assim, a curva binodal foi determinada pelo método de titulação turbidimétrica a 25 °C (± 1 °C) e à pressão atmosférica [29]. Foram preparadas soluções aquosas de dextrano a 25% (m/m) e de PEG a 50 % (m/m), e utilizadas para a determinação dos diagramas de fase. Foi efetuada a adição repetitiva, e gota a gota, da solução aquosa dextrano à solução de PEG até à deteção de uma solução turva, correspondente à região bifásica, seguida da adição gota a gota de água milli-Q até se detetar uma solução límpida, que indica a entrada na região monofásica [32]. Estas adições gota a gota foram realizadas perante agitação constante. A composição dos sistemas ternários foi determinada pela quantificação gravimétrica de todos os componentes adicionados, com uma incerteza de $\pm 10^{-4}$ g. Para além deste método direto descrito, foi necessário recorrer a um método indireto de obtenção do diagrama, uma vez que pelo método anterior não foi possível obter pontos suficientes para traçar o diagrama. No método indireto, a única alteração introduzida no procedimento é a adição repetitiva e gota a gota da solução aquosa do PEG à solução aquosa de dextrano até à deteção de uma solução turva, seguida da adição gota a gota de água até se detetar novamente uma solução límpida.

As TLs foram determinadas por um método gravimétrico originalmente descrito por Merchuk *et al.* [185]. Para tal, foram preparadas gravimetricamente misturas de PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H₂O na região bifásica, e de seguida vigorosamente agitadas. Para que ocorresse a separação das fases e a mistura atingisse o equilíbrio, as mesmas foram centrifugadas a 3500 rpm. durante um período de 30 minutos, numa centrífuga com rotor de ângulo fixo (Eppendorf). Após a etapa de separação, ambas as fases de topo e de fundo foram pesadas. Finalmente, cada TL foi determinada individualmente pela aplicação da regra da alavanca que traduz uma relação entre o peso da fase de topo e a composição total do sistema. A curva binodal experimental foi ajustada primeiramente utilizando a Equação 7 [185]:

$$[PEG] = A \exp[(B[dextrano]^{0.5}) - (C[dextrano]^3)] \quad (7)$$

em que $[PEG]$ e $[dextrano]$ são, respetivamente, a percentagem mássica de PEG e de dextrano, e A , B e C são constantes obtidas pela regressão.

Para a determinação das TLs, resolveu-se o seguinte sistema constituído por quatro equações (Equações 8 até 11) e quatro incógnitas ($[PEG]_{PEG}$, $[PEG]_{dextrano}$, $[dextrano]_{PEG}$ e $[dextrano]_{dextrano}$):

$$[PEG]_{PEG} = A \exp[(B[dextrano]_{PEG}^{0,5}) - (C[dextrano]_{PEG}^3)] \quad (8)$$

$$[PEG]_{dextrano} = A \exp[(B[dextrano]_{dextrano}^{0,5}) - (C[dextrano]_{dextrano}^3)] \quad (9)$$

$$[PEG]_{PEG} = \frac{[PEG]_M}{\alpha} - \left(\frac{1-\alpha}{\alpha}\right) [PEG]_{dextrano} \quad (10)$$

$$[dextrano]_{PEG} = \frac{[dextrano]_M}{\alpha} - \left(\frac{1-\alpha}{\alpha}\right) [dextrano]_{dextrano} \quad (11)$$

As designações subscritas PEG , $dextrano$ e M , representam a fase de topo, fase de fundo e ponto de mistura, respetivamente. O parâmetro α representa a razão entre a massa da fase de topo e a massa total da mistura. A resolução do sistema referido anteriormente permite-nos obter a concentração de PEG e de dextrano nas fases de topo e de fundo.

Finalmente, para o cálculo das *tie-line lengths* (TLLs), foi aplicada a Equação 12.

$$TLL = \sqrt{([dextrano]_{PEG} - [dextrano]_{dextrano})^2 + ([PEG]_{PEG} - [PEG]_{dextrano})^2} \quad (12)$$

2.3.4. Procedimento experimental para a extração de IgG comercial

2.3.4.1. Preparação dos SAB

Inicialmente, foi necessária a preparação da solução *stock* de IgG comercial a uma concentração de 1 mg/mL, a partir da solução de IgG Gammanorm® de concentração 165 mg/mL, para posterior utilização na formação de cada SAB.

A composição das misturas quaternárias foram escolhidas com base no diagrama de fase ternário do sistema PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H₂O já reportado na literatura [132] e determinado nas condições experimentais no capítulo 2.3.3. desta dissertação. Deste modo, SAB com uma massa final de 2 g foram preparados em eppendorfs através da pesagem das quantidades apropriadas dos componentes a partir de soluções *stock* de 50% (m/m) PEG 3350 e 25% (m/m) dextrano. A concentração de PEG e dextrano no sistema foi de 7% e 5%, respetivamente, tendo sido estudadas diferentes concentrações de cada LI. O carregamento da solução *stock* de IgG representou 30% da massa do sistema, exceto nos brancos em que não foi adicionada qualquer quantidade de IgG. Finalmente, adicionou-se água de modo a atingir a composição final desejada para o

sistema. Assim, as misturas foram preparadas gravimetricamente, com um erro associado de $\pm 10^{-6}$ g, e vigorosamente agitadas com auxílio de um vórtex (Ika). De forma a ser atingido o equilíbrio e garantindo a completa separação das fases, os sistemas foram centrifugados a 3500 rpm. durante um período de 30 minutos (período de tempo estabelecido em trabalhos de otimização prévios), numa centrífuga com rotor de ângulo fixo (Eppendorf), permitindo o particionamento completo da IgG entre as duas fases coexistentes.

Em todas as misturas consideradas para este tipo de sistema e com as composições utilizadas, a fase aquosa rica em PEG é a fase superior, ao passo que a fase aquosa rica em dextrano corresponde à fase inferior.

Seguidamente, os volumes foram determinados e as fases devidamente separadas, utilizando uma micropipeta para a remoção das fases superiores e uma seringa de 2 mL apropriada para a obtenção da fase inferior. Ambas as fases foram posteriormente analisadas, tendo sido quantificada a proteína presente em cada fase, e o coeficiente de partição, o rendimento e eficiência de extração e os respetivos desvios-padrão foram ainda determinados. O pH de ambas as fases coexistentes foi determinado a 25 °C (± 1 °C) e o conteúdo de IgG presente em cada fase foi quantificado de acordo com os procedimentos descritos anteriormente nos capítulos 2.2.3.2. e 2.2.3.3., respetivamente.

2.3.4.2. Determinação dos coeficientes de partição e rendimentos/eficiências de extração da IgG

Os coeficientes de partição da proteína, K_{IgG} , foram determinados de acordo com a Equação 13,

$$K_{IgG} = \frac{[IgG]_{PEG}}{[IgG]_{dextrano}} \quad (13)$$

em que $[IgG]_{PEG}$ e $[IgG]_{dextrano}$ representam a concentração total da IgG na fase aquosa rica em PEG e em dextrano, respetivamente. O rendimento de extração de IgG para a fase rica em PEG foi determinado através da Equação 14, abaixo mencionada,

$$\%Y_{IgG} = \frac{[IgG]_{PEG} \times V_{PEG}}{[IgG]_{inicial} \times V_{inicial}} \times 100 \quad (14)$$

em que $[IgG]_{PEG}$ representa a concentração de IgG na fase aquosa rica em PEG, $[IgG]_{inicial}$ representa a concentração de IgG adicionada inicialmente a partir do *stock* para a formação do sistema, e os parâmetros V_{PEG} e $V_{inicial}$ representam o volume da fase aquosa rica em PEG e o volume da solução *stock* adicionada ao sistema, respetivamente. A eficiência de extração foi determinada através da Equação 15

$$\%EE_{IgG} = \frac{[IgG]_{PEG} \times V_{PEG}}{[IgG]_{PEG} \times V_{PEG} + [IgG]_{dextrano} \times V_{dextrano}} \times 100 \quad (15)$$

em que $[IgG]_{PEG}$ e $[IgG]_{dextrano}$ representam a concentração de proteína na fase aquosa rica em PEG e dextrano, respetivamente, e os parâmetros V_{PEG} e $V_{dextrano}$ representam o volume da fase aquosa rica em PEG e em dextrano, respetivamente. Possíveis interferências do PEG 3350, do dextrano 500 kDa e dos vários LIs com os métodos analíticos foram investigadas e não aparentaram ser consideráveis nas condições em que se realizou o trabalho e diluições efetuadas.

2.3.4.3. Determinação dos coeficientes de partição e eficiências de extração dos LIs

Dado que os sistemas quaternários têm também na sua composição LIs, a própria partição de alguns dos LIs entre as fases coexistentes foi também estudada. Nesse sentido, os LIs da família dos imidazólios em estudo ($[C_4mim]Cl$, $[C_4mim]Br$ e $[C_4mim][HSO_4]$) foram quantificados em cada fase, através de espectroscopia UV, usando o Espectrómetro Spectramax 384 Plus da Molecular Devices (Sunnyvale, CA, EUA), sendo as leituras efetuadas a 211 nm, dado que se trata do comprimento de onda de absorção máxima para o anel aromático imidazólio e tal como comprovado experimentalmente. Mais ainda, foi estudada a partição dos LIs $[N_{1111}]Cl$, $[Ch]Cl$ e $[P_{4444}]Cl$ através da sua quantificação nas duas fases coexistentes recorrendo a um Metrohm 904 Titrand equipped with an electrode selective for chlorides, e por quantificação do anião cloreto (Cl^-) constituinte de cada IL, por relação estequiométrica. As amostras das fases superior e inferior contendo o LI foram diluídas 100 vezes em água ultra-pura milli-Q e solução TISAB (contendo nitrato de potássio 0,1 M, ácido acético 0,1 M e acetato de sódio 0,1 M) de forma a manter a força iónica das amostras para posterior análise, com o auxílio do software Tiamo™ 2.3. A leitura das amostras foi realizada em condições de agitação permanente, e com intervalos de 5 minutos entre leituras, de forma a restabelecer a força iónica do eletrodo em solução TISAB. A concentração do anião cloreto (Cl^-) foi posteriormente determinada a partir de uma curva de calibração preparada de fresco a cada ensaio de quantificação, e obtida utilizando KCl como padrão. Os padrões de Cl^- preparados variaram numa gama de concentrações compreendidas entre 0,1 e 100 mmol/L, tal como é possível observar na Figura C.1 do Anexo C, que representa o exemplo de uma curva de calibração obtida utilizando este procedimento.

O coeficiente de partição de cada LI em cada sistema, K_{LI} , foi determinado recorrendo à Equação 16, abaixo apresentada.

$$K_{LI} = \frac{[LI]_{PEG}}{[LI]_{dextrano}} \quad (16)$$

em que $[LI]_{PEG}$ e $[LI]_{dextrano}$ representam as concentrações de LI na fase aquosa rica em PEG e na fase aquosa rica em dextrano, respetivamente. Também a eficiência de extração de cada um dos LIs foi determinada através da Equação 17.

$$\%EE_{LI} = \frac{[LI]_{PEG} \times V_{PEG}}{[LI]_{PEG} \times V_{PEG} + [LI]_{dextrano} \times V_{dextrano}} \times 100 \quad (17)$$

em que $[LI]_{PEG}$ e $[LI]_{dextrano}$ representam a concentração de LI na fase aquosa rica em PEG e dextrano, respetivamente, e os parâmetros V_{PEG} e $V_{dextrano}$ representam a massa da fase aquosa rica em PEG e em dextrano, respetivamente.

2.3.5. Procedimento experimental para a extração de IgG anti-IL-8 a partir de sobrenadantes de culturas celulares CHO

2.3.5.1. Preparação dos SAB

Inicialmente, foi necessária a produção de anticorpos monoclonais anti-IL-8 através de tecnologia celular mamífera de acordo com o procedimento apresentado no capítulo 2.1. desta dissertação. Os sobrenadantes das culturas celulares contendo os anticorpos monoclonais foram então utilizados diretamente na preparação dos SAB de extração, constituindo assim a matriz real em estudo.

A composição das misturas quaternárias foram escolhidas tendo por base os sistemas/condições mais promissoras para a extração de IgG resultantes do processo de otimização com IgG comercial. Deste modo, SAB com uma massa final de 2 g foram preparados em eppendorfs através da pesagem das quantidades apropriadas dos componentes a partir de soluções *stock* de 50% (m/m) PEG 3350 e 25% (m/m) dextrano. A concentração de PEG e dextrano no sistema foi de 7% e 5%, respetivamente, tendo sido estudadas as diferentes concentrações dos LIs que se revelaram mais promissoras. O sobrenadante celular representou a percentagem máxima da massa do sistema com maior quantidade de LI adicionado como adjuvante. Foram preparados brancos, em que não foi adicionada qualquer quantidade de sobrenadante. Finalmente, adicionou-se água de modo a atingir a composição final desejada para os sistemas com menores quantidades de LI. Assim, as misturas foram preparadas gravimetricamente, com um erro associado de $\pm 10^{-3}$

⁶ g, e vigorosamente agitadas com auxílio de um vórtex (Ika). De forma a ser atingido o equilíbrio e garantindo a completa separação das fases, os sistemas foram centrifugados a 3500 rpm durante um período de 30 minutos (período de tempo estabelecido em trabalhos de otimização prévios), numa centrífuga com rotor de ângulo fixo (Eppendorf), permitindo o particionamento completo da IgG e das restantes impurezas proteicas entre as duas fases coexistentes.

Em todas as misturas consideradas para este tipo de sistema e com as composições utilizadas, a fase aquosa rica em PEG é a fase superior, ao passo que a fase aquosa rica em dextrano corresponde à fase inferior.

Seguidamente, os volumes foram determinados e as fases devidamente separadas, utilizando uma micropipeta para a remoção das fases superiores e uma seringa de 2 mL apropriada para a obtenção da fase inferior. Ambas as fases foram posteriormente analisadas, tendo sido quantificada a IgG e as proteínas totais presentes em cada fase, e o coeficiente de partição, o rendimento e eficiência de extração da IgG e os respetivos desvios-padrão foram ainda determinados. O pH de ambas as fases coexistentes foi determinado a 25 °C (± 1 °C) e o conteúdo de IgG presente em cada fase foi quantificado de acordo com os procedimentos descritos anteriormente nos capítulos 2.2.3.2. e 2.2.3.3., respetivamente.

2.3.5.2. Determinação dos coeficientes de partição e rendimentos/eficiências de extração da IgG

Os coeficientes de partição da proteína, K_{IgG} , foram determinados de acordo com a Equação 13, o rendimento de extração de IgG para a fase rica em PEG foi determinado através da Equação 14, e a eficiência de extração foi determinada através da Equação 15, todas anteriormente descritas no capítulo 2.3.4.4. desta dissertação.

O coeficiente de partição das impurezas proteicas em cada sistema, $K_{impurezas}$, foi também determinado recorrendo à Equação 18, abaixo apresentada.

$$K_{impurezas} = \frac{[impurezas]_{PEG}}{[impurezas]_{dextrano}} \quad (18)$$

em que $[impurezas]_{PEG}$ e $[impurezas]_{dextrano}$ representam as concentrações de impurezas proteicas totais na fase aquosa rica em PEG e na fase aquosa rica em dextrano, respetivamente.

Possíveis interferências do PEG 3350, do dextrano 500 kDa e dos LIs com os métodos analíticos foram investigadas e não aparentaram ser consideráveis nas condições em que se realizou o trabalho e diluições efetuadas.

2.3.5.3. Determinação do nível de pureza da IgG

Uma vez que os sobrenadantes das culturas celulares CHO se tratam de uma matriz real bastante complexa, contendo outras proteínas para além da IgG, torna-se relevante calcular o nível de pureza específico da IgG na fase rica em PEG após a etapa de SAB. Para isso são necessários os dados da quantificação da IgG por cromatografia de afinidade obtidos no capítulo 2.3.5.3. desta dissertação, e torna-se necessário quantificar as proteínas totais presentes em cada fase (que inclui a IgG + impurezas proteicas).

Deste modo, a concentração das proteínas solúveis totais presentes em ambas as fases coexistentes foi determinada pelo método de Bradford [186], utilizando o *kit* Coomassie Plus da Pierce. Este método é baseado na observação de que o azul brilhante e Coomassie G-250 pode apresentar duas cores diferentes, vermelho e azul. A sua forma vermelha é convertida para a forma azul aquando da ligação da proteína ao corante, uma vez que esta ligação causa a alteração do comprimento máximo de absorção do corante para 595 nm. Os ensaios foram realizados em microplacas de poliestireno com 96 poços, nas quais 200 µL do reagente de Coomassie foram adicionado a 50 µL das amostras, brancos e soluções padrão. De seguida, a placa foi agitada num agitador de microplacas durante um período de 30 segundos e incubada durante um período de 10 minutos à temperatura ambiente. Finalmente, as absorvâncias foram determinadas a um comprimento de onda de 595 nm num leitor de microplacas SPECTROstar® Nano da BMG Labtech. De modo a evitar interferências do PEG, dextrano e LI no método, todas as amostras das fases superior e inferior foram analisadas contra sistemas brancos, contendo a mesma composição das fases mas sem a presença de proteínas. Para além disso, foram efetuados ensaios preliminares no sentido de otimizar a diluição das fases e de validar o método para a quantificação das proteínas totais na presença dos componentes do SAB.

A concentração das proteínas totais foi posteriormente determinada a partir de uma curva de calibração preparada de fresco a cada ensaio de quantificação, e obtida utilizando BSA como biomolécula-padrão. Os padrões de BSA preparados variaram numa gama de concentrações compreendidas entre 5 e 400 mg/L, tal como é possível observar na Figura

D.1 do Anexo D, que representa o exemplo de uma curva de calibração obtida utilizando este procedimento.

Assim, o nível de pureza da IgG em cada fase do sistema, $\%Pureza_{IgG}$, foi determinado recorrendo à Equação 19, abaixo apresentada

$$\%Pureza_{IgG} = \frac{[IgG]}{[Proteínas]} \quad (19)$$

em que $[IgG]$ e $[Proteínas]$ representam as concentrações de IgG e das proteínas totais na fase, respetivamente.

2.3.6. Avaliação da integridade/estabilidade da IgG após a etapa de extração

2.3.6.1. Avaliação do perfil proteico

De forma a avaliar e confirmar a extração seletiva da IgG face às restantes impurezas proteicas dos sobrenadantes das culturas celulares, bem como a integridade e manutenção do peso molecular da proteína, após cada etapa de quantificação, foi investigado o perfil proteico das fases aquosas coexistentes. Assim, os perfis de distribuição proteica por ambas as fases dos sistemas em estudo foram investigados por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), de modo a avaliar qualitativamente a presença e distribuição relativa de IgG e das restantes impurezas proteicas por ambas as fases.

As amostras foram preparadas e diluídas em tampão de carregamento contendo 62,5 mM Tris-HCl pH 6,2, 2% SDS, 0,01% azul de bromofenol e 10% glicerol, e desnaturadas em condições redutoras através da adição de 0,1 M DTT e de uma etapa de aquecimento da amostra a 100°C durante um período de 5 minutos. Assim, para um volume final de 50 µL, foram adicionados 25 µL de tampão de carregamento, 5 µL de DTT e 20 µL de amostra da fase. Um volume de 20 µL de cada amostra diluída foi carregado num gel de poliacrilamida (stacking gel: 12% T, 3,3% C; gel resolvente: 4% T, 3,3% C), preparado a partir de uma solução *stock* 40% acrilamida/bisacrilamida (29:1 com um tampão de corrida cuja composição inclui 25 mM Tris-HCl, 192 mM glicina e 0,1% (m/v) SDS a pH 8,3. Utilizou-se um padrão de pesos moleculares de proteínas para o SDS-PAGE, *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* (Bio-rad). Os géis foram coradas com um procedimento habitual de coloração, em solução aquosa contendo azul brilhante de Coomassie R-250 0,1% (m/v), etanol 30% (v/v), ácido acético 10% (v/v) e água, num agitador orbital e a uma velocidade moderada, durante o tempo necessário a uma

temperatura de 40°C. Os géis foram descorados através da sua lavagem numa solução contendo ácido acético a 10% (v/v), etanol a 30 % (v/v) e água, num agitador orbital a uma velocidade moderada, até ao desaparecimento da cor de fundo do gel e à temperatura ambiente. Posteriormente, os géis foram armazenados em água milli-Q À temperatura ambiente. Finalmente, as imagens digitais dos géis foram adquiridas através de um densitómetro calibrado GS-800 (Bio-rad) e todos os géis foram analisados utilizando a ferramenta de análise Quantity One 4.6 (Bio-rad).

2.3.6.2. Determinação do ponto isoeletrico (pI) das proteínas

O pI das proteínas presentes na IgG Gammanorm, nos sobrenadantes das culturas celulares CHO DP-12, e nas fases superior e inferior dos sistemas mais promissores foi determinado por focagem isoeletrica (IEF) num aparelho de eletroforese PhastSystem™ da Pharmacia/GE Healthcare. Para tal, foi utilizado um gel horizontal IEF PhastGel® 3-9 com 50×46×0,45 mm da GE Healthcare. Este gel trata-se de um gel de poliacrilamida homogéneo pré-fabricado (5% T e 3% C) contendo 2-6% de Pharmalyte® como anfólitos de transporte. Pharmalyte® gera gradientes estáveis e lineares de pH com condutividade uniforme em toda a gama de pH, permitindo forças de campo superiores a 500 V/cm para separações de elevada resolução. Cada corrida demorou 500 Vh (aproximadamente 30 minutos). A etapa de pré-focagem demorou cerca de 10 minutos. O marcador de pIs utilizado foi o *kit* Broad Pi (3-10) da GE Healthcare, contendo os seguintes componentes: amilglucosidase (pI=3.50); vermelho metilo (pI=3.75); inibidor da tripsina (pI=4.55); β-lactoglobulina A (pI=5.20); anidrase carbónica bovina B (pI=5.85); anidrase carbónica humana B (pI=6.55); banda ácida da mioglobina (pI=6.85); banda básica da mioglobina (pI=7.35); lectina lentil acídica (pI=8.15); lectina lentil média (pI=8.45); lectina lentil básica (pI=8.65) e tripsinogénio (pI=9.30). Os géis foram corados por coloração com nitrato de prata, envolvendo várias etapas, nomeadamente: fixação em solução 20% (m/v) ácido tricloroacético durante 5 minutos a 20°C; lavagem em solução 50% (v/v) etanol/10% (v/v) ácido acético durante 2 minutos a 50°C; lavagem em solução 10% (v/v) etanol/5% (v/v) ácido acético durante 6 minutos a 50°C; sensibilização em solução 8,3% (m/v) glutaraldeído durante 6 minutos a 50°C; lavagem em solução 10% (v/v) etanol/5% (v/v) ácido acético durante 8 minutos a 50°C; lavagem com água milli-Q durante 4 minutos a 50°C; coloração com nitrato de prata em solução 0,5% (m/v) de nitrato de prata durante 10 minutos a 40°C; lavagem com água milli-Q durante 1 minutos a 30°C;

desenvolvimento da coloração em solução 0,015% (v/v) formaldeído/2,5% (m/v) carbonato de sódio durante 5 minutos a 30°C; finalmente, de forma a parar a reação, sujeita-se o gel a um banho numa solução 5% (v/v) de ácido acético durante 5 minutos a 50°C. Posteriormente, as imagens digitais dos géis foram adquiridas através de um densitómetro calibrado GS-800 (Bio-rad) e todos os géis foram analisados utilizando a ferramenta de análise Quantity One 4.6 (Bio-rad).

2.3.6.3. Avaliação da estabilidade da estrutura secundária da IgG

A estabilidade estrutural e análise da estrutura secundária da proteína foi avaliada para alguns dos sistemas/condições mais promissoras para a extração de IgG e para as condições menos favoráveis, quando aplicável (de acordo com o espectro de absorção do LI em causa), por dicroísmo circular (DC). Os estudos de DC foram realizados através de um espetropolarímetro Applied Photophysics PiStar-180 (Leatherhead, Reino Unido), com uma unidade de controlo de temperatura Peltier (Melcor MTCA). O porta-amostras utilizado foi uma cuvette de quartzo Suprasil da Hellma Analytics, com um percurso ótico de 0,1 cm.

As medições foram realizadas na zona Far-UV (198-250 nm) do espectro eletromagnético e consistiram numa acumulação de 10 espectros com uma constante de tempo de 1 segundo e uma velocidade de aquisição de 1 nm/s. A largura de banda do monocromador foi configurada para 5 nm e o Peltier configurado para 25°C. Assim, foram obtidos os espectros para cada uma das amostras controlo, preparadas em água ultra-pura milli-Q e em tampão 50 mM de fosfato com uma concentração de IgG de 1 g/L, e posteriormente foram obtidos os espectros das fases superiores dos sistema em estudo, tendo estes sido corrigidos com o branco correspondente (amostra sem proteína). Sempre que necessário, as amostras foram diluídas de forma a que o potencial elétrico do equipamento não ultrapassasse os 1000 V e causasse danos no sistema ótico.

Para cada caso, a concentração exata de proteína presente na amostra foi determinada através da lei de Beer-Lambert, determinando a absorvância das amostras a 280 nm por espectrofotometria-UV, com um espectrofotómetro Hitachi U-200, e considerando o coeficiente de extinção molar da IgG $\epsilon = 21000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ e um percurso ótico da célula $l = 0,1 \text{ cm}$.

Os dados de DC são apresentados em unidades de elipticidade molar ($\text{deg} \cdot \text{cm}^2/\text{dmol}$), considerando a massa molecular (MM) da IgG $\text{MM} = 150000 \text{ g/mol}$ [24]

e 772 resíduos de aminoácidos presentes na sua estrutura primária (informação retirada do website Protein Data Bank (<http://rcsb.org/pdb>); código PDB-ID para a IgG humana: 1HZH).

2.3.6.4. Avaliação da estabilidade da estrutura terciária da IgG

A análise da estabilidade da estrutura terciária da proteína foi avaliada para alguns dos sistemas/condições mais promissoras para a extração de IgG e para as condições menos favoráveis, para as quais a estrutura secundária foi igualmente estudada, por espectroscopia de fluorescência. Estes estudos foram conduzidos num espectrómetro de fluorescência Varian Cary Eclipse, da Agilent Technologies, com uma geometria de 90°. O porta-amostras utilizado foi uma cuvete de fluorescência, com um percurso ótico de 1 cm.

As amostras controlo (H₂O ultra-pura milli-Q + IgG e PBS (50 mM) + IgG) e as amostras provenientes dos SAB (fases superiores dos sistemas PEG + dextrano + IgG e PEG + dextrano + LI + IgG) foram diluídas 1:10 com água ultra-pura milli-Q, antes de serem analisadas no espectrofotómetro de fluorescência.

A excitação das amostras foi realizada a 280 nm (excitação dos resíduos de triptofano e tirosina) através de uma fenda de 5 nm de largura, a emissão foi registada nos comprimentos de onda compreendidos entre 290 nm e 500 nm, através de uma fenda de 5 nm de largura, e o ganho do fotomultiplicador foi definido em modo elevado. A resposta do instrumento em cada comprimento de onda foi corrigida automaticamente de acordo com as indicações do fabricante. O valor de intensidade da fluorescência a cada comprimento trata-se do valor médio de 3 repetições da leitura da mesma amostra. Após a obtenção dos espectros finais de cada amostra, estes foram corrigidos tendo em consideração o espectro do branco respetivo. Para além disso, os valores das intensidades obtidas são altamente dependentes da concentração de proteína na amostra, e uma vez que a quantidade de proteína presente em cada amostra foi variável (uma vez que nas amostras provenientes dos SAB há que ter em consideração a partição variável da proteína pelas fases coexistentes), todos os espectros foram normalizados relativamente ao valor máximo de intensidade obtido de forma a evitar discrepâncias resultantes da concentração de anticorpo na amostra.

3. Resultados e Discussão

3.1. Produção de anticorpos monoclonais anti-IL-8

Um dos objetivos iniciais desta tese passou pela produção de anticorpos monoclonais através de linhas celulares animais, mais especificamente através de células CHO. Deste modo, os anticorpos monoclonais anti-inteuleucina-8 humana (anti-IL-8) foram produzidos por uma linha celular CHO DP-12, que foi caracterizada e estudada ao longo das várias passagens.

Inicialmente, foram desenvolvidos estudos morfológicos das células CHO DP-12 utilizadas neste trabalho, tendo a sua morfologia sido estudada em vários momentos, nomeadamente imediatamente após a passagem celular e ao longo dos 4 dias de cultura, antes da passagem seguinte. Os resultados das imagens microscópicas obtidas para ilustrar a sua morfologia, encontram-se apresentados na Figura 10, sendo possível observar diferentes ampliações da cultura para uma melhor compreensão e observação dos detalhes abaixo discutidos.

De facto, é possível constatar alterações na forma das células ao longo do tempo de cultura. Após a passagem celular, tal como apresentado na Figura 10 (A) e (B), é possível constatar que as células apresentam uma forma arredondada/esférica e que se encontram em suspensão no meio de cultura, sob a forma de célula única (*single-cell*). Contudo, verifica-se que ao longo do tempo de cultura (Figura 10), estas células adquirem uma morfologia em forma de fibroblastos, isto é, com uma forma mais alongada. Mais ainda, as células aderem ao fundo do frasco T, tratando-se de uma cultura de células aderentes, tal como se observa já no fim do tempo de cultura, na Figura 10 (I).

A sua adesão e consequente alteração morfológica pode ser explicada pela presença de fatores de adesão celular habitualmente presentes nos meios que contêm soro, fatores estes que medeiam importantes interações bidirecionais entre as células e a matriz extracelular e que, por isso mesmo, apresentam um papel crucial na migração celular, proliferação e determinação do destino da célula [187]. Esta regulação recíproca e dinâmica dos processos intracelulares é mediada por recetores de membrana, como é o caso das integrinas, bem como de outros componentes que compõe o adesoma, como por exemplo caderinas e moléculas de adesão celular [188, 189]. Assim, a presença de fatores de adesão da matriz extracelular no meio de cultura, como a fibronectina e a vitronectina [190], levaram possivelmente à proliferação destas células aderidas ao frasco T.

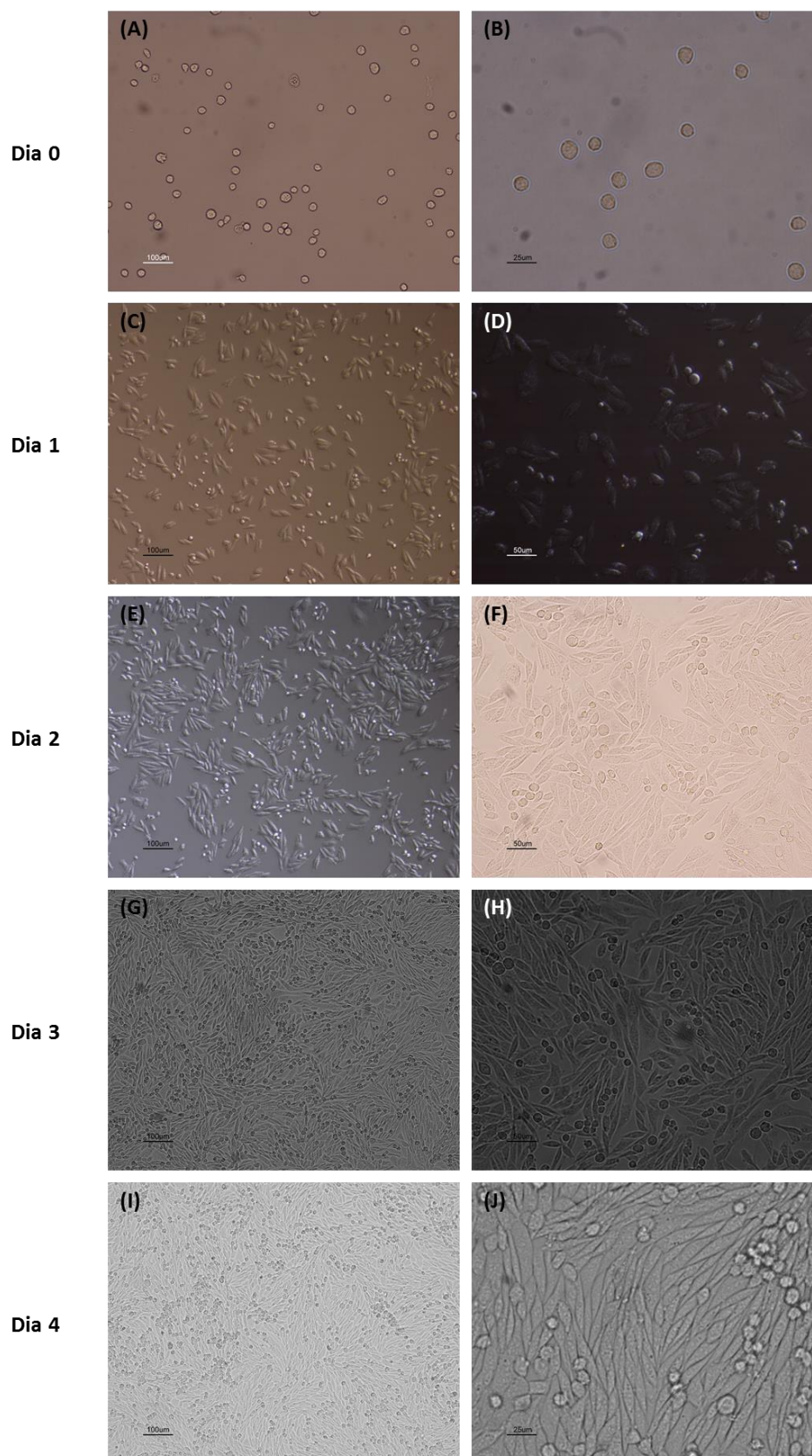


Figura 10 – Evolução da morfologia das células CHO DP-12 ao longo dos 4 dias de cultura num meio 25% DMEM/ 75% ProCHO™5: (A) e (B) – dia 0 (após a passagem celular), ampliada 100x e 400x respetivamente; (C) e (D) – dia 1, ampliada 100x e 400x respetivamente; (E) e (F) – dia 2, ampliada 100x e 200x respetivamente; (G) e (H) – dia 3, ampliada 100x e 200x respetivamente; (I) e (J) – dia 4, ampliada 100x e 400x respetivamente.

Após um dia de cultura estes fenómenos já são observáveis, uma vez que através da Figura 10 (D) constata-se a existência de várias células já em forma de fibroblasto aderidas ao plástico do fundo do frasco T, o que não se verificava no dia da passagem celular (Figura 10 (A)). No entanto, grande parte das células encontram-se ainda com uma forma arredondada, tratando-se em alguns casos de células que ainda não aderiram ao frasco T por ainda não terem interagido com os fatores de adesão presentes no meio, e noutros casos de células que já não irão aderir nem alterar a sua forma ou que simplesmente não se encontram viáveis. O mesmo comportamento é verificado, de uma forma geral, para o segundo dia de cultura (Figura 10 (E) e (F)). Já no terceiro dia, verifica-se que a cultura se tornou bastante confluenta, existindo um grande número de células aderidas ao frasco T e com a forma típica de fibroblasto. Finalmente, no quarto dia de cultura, a principal diferença denotada centra-se na elevada confluência da cultura (Figura 10 (I)). Contudo, é importante salientar a presença de alguns conjuntos de células com uma forma esférica em determinados locais da cultura, tal como se pode observar na Figura 10 (J). Tal situação pode ser resultado da elevada confluência da cultura, uma vez que devido à falta de espaço, algumas das células acabam por se soltar do fundo do frasco T, sofrendo, conseqüentemente, uma mudança de conformação para uma forma esférica, mesmo continuando a tratar-se de células aderidas. Para além disso, algumas das células esféricas que são ainda visualmente detetáveis, podem tratar-se de células que não aderiram ao frasco e se tornaram inviáveis, ou de células suspensas que de alguma forma sofreram adaptação e aquisição preferencial dos fatores que compõem o meio sem soro (ProCHOTM5) que constitui 75% do meio de cultura utilizado. Para uma melhor compreensão deste fenómeno, torna-se relevante perceber quais as principais diferenças que seriam observáveis na cultura na presença de um meio exclusivamente sem soro. Assim, se o meio de cultura utilizado fosse constituído apenas por ProCHOTM5, seria expectável a obtenção de uma cultura em suspensão, constatando-se a presença de alguns pequenos agregados de células em forma de agregados tridimensionais (3D). Uma vez que o meio sem soro não possui o conteúdo proteico do FBS, é quase que desprovido de fatores de adesão, que promovem a adesão das células à superfície do frasco de cultura. Para além disso, a ação das integrinas pode ser anulada por inibidores presentes no meio ProCHOTM5, que é habitualmente utilizado na formulação de meios de cultura para células CHO que crescem em suspensão, e em que, conseqüentemente, não há interesse em fomentar a sua adesão. Este fenómeno de inibição já foi descrito e é tipicamente acompanhado através da marcação do sítio de ligação ao ligando, através da utilização de

anticorpos, péptidos cíclicos, desintegrinas, peptidomiméticos e outras pequenas moléculas antagonistas [191]. Deste modo, possivelmente pelos motivos discutidos anteriormente e pela ausência de associações específicas entre as células e os fatores da matriz, verificar-se-ia a intensificação das interações célula-célula e a sua consequente proliferação em suspensão, em forma de agregados 3D. Por tudo isto, torna-se intuitivo que a minoria das células da cultura em estudo que se tenham adaptado preferencialmente aos fatores deste tipo de meio, sejam as células arredondadas suspensas que se perpetuam ao longo do tempo da cultura, e que acabaram por ser eliminadas, juntamente com as células não viáveis, por centrifugação antes da passagem celular subsequente.

Seguidamente, a proliferação celular da cultura CHO DP-12 foi estudada ao longo de seis passagens, determinando-se parâmetros respeitantes ao crescimento celular e à produção dos anticorpos de interesse.

De uma forma geral, tendo em consideração os valores da densidade celular obtidos após cada passagem, e que se encontram representados graficamente na Figura 11, é possível constatar dois momentos distintos durante a expansão celular: até à terceira passagem, a densidade celular mantém-se aproximadamente constante, em valores compreendidos entre $4,33 \times 10^6$ e $4,65 \times 10^6$ células/mL; a partir da quarta passagem, ocorre um crescimento da densidade celular em cerca de 2 milhões de células/mL, para valores compreendidos entre $6,53 \times 10^6$ e $6,62 \times 10^6$ células/mL.

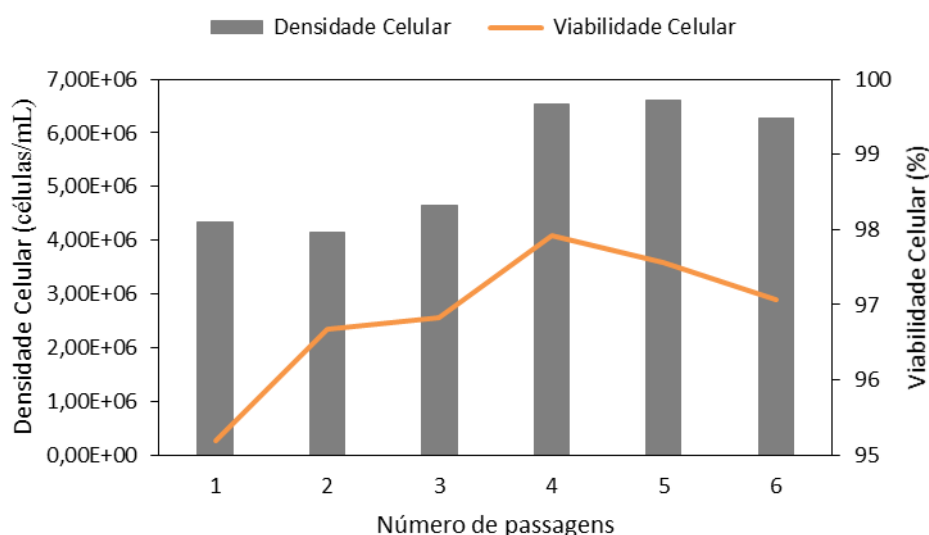


Figura 11 – Proliferação das células CHO DP-12 num meio 25% DMEM/ 75% ProCHO™5, avaliada em termos da sua densidade e viabilidade celular durante a expansão da cultura celular em frascos T ao longo de 6 passagens.

Para além disso, apesar de a viabilidade celular se ter mantido bastante elevada em todas as passagens (superior a 95%), é possível constatar que acompanhou a tendência da

densidade celular nas primeiras 3 passagens, atingindo um máximo à quarta passagem, com uma viabilidades celulares superiores em 3 pontos percentuais, comparativamente com a primeira passagem. Contudo, desde a quarta até à sexta passagem verifica-se um decréscimo contínuo em termos de viabilidade celular. Este facto faz todo o sentido, tendo em consideração que nestas passagens a densidade celular era maior, o que pode ter consequentemente levado a uma mais rápida depleção de nutrientes (como por exemplo glucose e glutamina) e a acumulação de metabolitos (como por exemplo lactato e amónia), causando um decréscimo mais precoce da viabilidade celular. Deste modo, é possível concluir que a partir da quarta passagem as células não só conseguiram aumentar a sua sobrevivência comparativamente com as primeiras passagens, uma vez que o número de células viáveis aumentou, como também aumentaram a sua reprodução, justificado pelo aumento de densidade celular.

No sentido de avaliar e caracterizar a cultura celular quanto ao seu metabolismo, na Figura 12 apresentam-se os dados referentes à sua produtividade ao longo das várias passagens, expressa em μg de IgG anti-IL-8 produzido por célula por cada dia de cultura e o pH do meio em cada passagem. A produtividade variou assim entre $4,11 \times 10^{-6} \mu\text{g}/\text{dia}$ e $7,79 \times 10^{-6} \mu\text{g}/\text{dia}$, observando-se uma vez mais, um padrão crescente neste parâmetro ao longo das várias passagens.

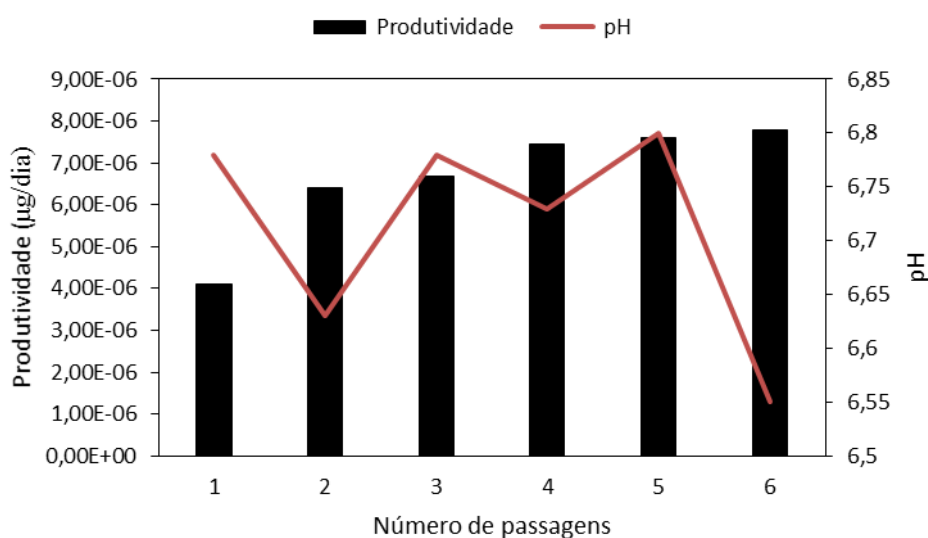


Figura 12 – Proliferação das células CHO DP-12 num meio 25% DMEM/ 75% ProCHOTM5, avaliada em termos da sua produtividade e pH do meio durante a expansão da cultura celular em frascos T ao longo de 6 passagens.

A partir da quarta passagem, a produtividade manteve-se aproximadamente constante, o que significa que a partir desta passagem, as células atingiram um plateau de estabilidade e consequentemente, começaram a apresentar uma produtividade específica

para a IgG aproximadamente constante. Para além disso, verifica-se em todos os casos um valor de pH inferior a 7, e compreendido no intervalo [6,55 – 6,78], causado pela acumulação de ácido láctico proveniente do metabolismo celular, que promove a acidificação do meio extracelular. De facto, na sexta passagem em que se verifica a produtividade mais elevada alcançada, também se verifica o valor de pH mais baixo. Este facto pode estar relacionado com um aumento na taxa metabólica das células, uma vez que já se encontravam bem adaptadas ao meio, que justifica o aumento da produção de IgG por célula, bem como do ácido láctico resultante do seu metabolismo.

Relativamente à concentração de anticorpo, uma vez que tanto a densidade celular como a produtividade das células aumentam ao longo das várias passagens, torna-se intuitivo que o mesmo aconteça com o anticorpo tal como é possível verificar na Figura 13 abaixo apresentada. Em média, a concentração de IgG anti-IL-8 obtida por sobrenadante foi de $75,28 \pm 28,70$ mg/L. De facto este valor apresenta um desvio-padrão bastante elevado dado que nas primeiras duas passagens a concentração de anticorpo obtida foi bastante menor do que a concentração obtida nos sobrenadantes resultantes das últimas passagens. Uma vez mais, este fenómeno pode ser justificado pela adaptação das células ao meio que ocorre gradualmente ao longo das passagens, e em que embora inicialmente o maior interesse das células seja o de adaptarem-se, sobreviverem e de reproduzirem-se, após a sua adaptação começam a produzir maiores quantidades de anticorpo como resultado de atingirem o seu normal metabolismo.

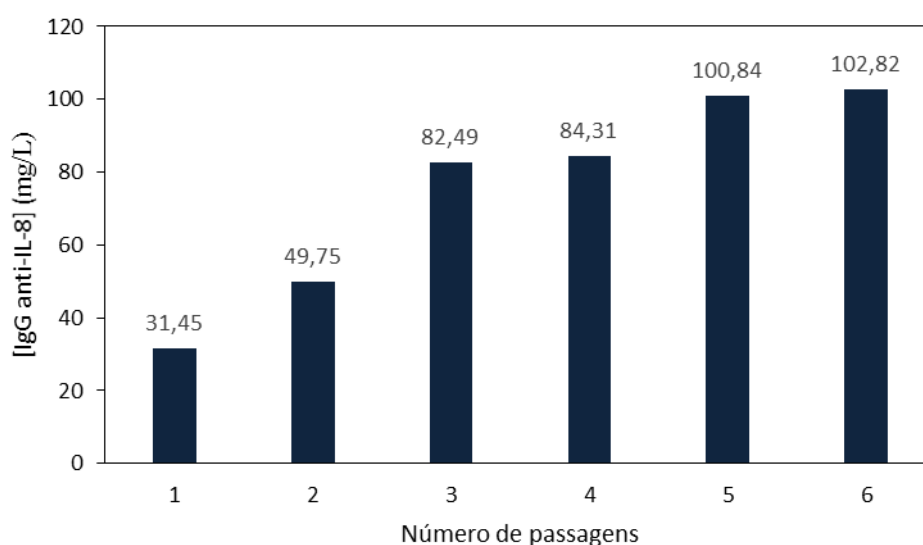


Figura 13 – Produção de anticorpos monoclonais IgG anti-IL-8, por células CHO DP-12 num meio 25% DMEM/ 75% ProCHO™5, expressa em concentração de anticorpo produzido (mg/L) durante a expansão da cultura celular em frascos T ao longo de 6 passagens.

Fazendo uma análise integrada de todos estes dados referentes à cultura celular em estudo, é possível denotar assim um período de sobrevivência e adaptação ao meio e às condições de cultura por parte das células, nas primeiras passagens após o seu descongelamento. Durante as primeiras três passagens, esta adaptação foi mais notória uma vez que a densidade celular apresentou-se mais baixa, sofrendo um incremento considerável a partir da quarta passagem, significando que a partir desta, as células, para além da sua sobrevivência, começaram a garantir também a sua reprodução. Apenas após terem a sua sobrevivência/reprodução garantida, é que estas começam a produzir e excretar para o meio extracelular de forma mais notória os anticorpos monoclonais anti-IL-8, atingindo concentrações superiores a 100 mg/L. Consequentemente, esta situação traduz-se num crescimento gradual da produtividade da cultura ao longo do tempo, encontrando-se de acordo com o aumento da densidade celular e da concentração de IgG verificado nessas condições. A gama de concentrações de IgG obtidas ao longo das várias passagens (31 – 103 mg/L) é comparável à gama de concentrações já reportada na literatura (41 – 91 mg/L) para o mesmo tipo de cultura com células CHO DP-12 em expansão num meio num meio 25% DMEM/ 75% ProCHOTM5 [192].

Uma vez que a concentração máxima de anticorpos obtida neste trabalho foi ainda superior ao máximo reportado em trabalhos anteriores [192], é possível concluir que a cultura celular foi estabelecida com sucesso para a produção de anticorpos monoclonais anti-IL-8, sem que se tenha verificado a desintegração do plasmídeo que codifica para o anti-IL-8 do genoma das células CHO DP-12 ao longo das passagens, visto não se ter verificado um decréscimo abrupto na concentração de IgG produzida nem na produtividade da cultura. Assim sendo, após o período de adaptação da cultura pós-congelamento, foi possível a obtenção de sobrenadantes das culturas celulares bastante semelhante e uniformes no que concerne à sua consistência e composição quantitativa de anticorpos monoclonais e das restantes impurezas proteicas, que foram posteriormente utilizados nas etapas seguintes de processamento apresentadas nesta dissertação.

3.2. Caracterização dos *stocks* de IgG

Antes de iniciar os estudos referentes ao processamento a jusante dos anticorpos, os sobrenadantes das culturas celulares CHO contendo a IgG foram caracterizados, de modo a estabelecer uma avaliação dos componentes da matriz real em estudo neste trabalho,

bem como da pureza da IgG nos sobrenadantes, uma vez que as propriedades químicas e físicas das proteínas são decisivas no comportamento de partição das proteínas em SAB.

Deste modo, a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi a técnica selecionada para a caracterização qualitativa da pureza da amostra, uma vez que é possível identificar as bandas referentes à proteína de interesse e às restantes impurezas proteicas, sendo que, quando corados com azul de Coomassie, a intensidade das bandas é proporcional à concentração da proteína a que a banda se refere. Assim, a Figura 14 ilustra o perfil proteico das diferentes soluções *stock* contendo IgG que foram utilizadas ao longo desta dissertação, nomeadamente a solução de IgG pura Gammanorm e os sobrenadantes das culturas celulares CHO DP-12.

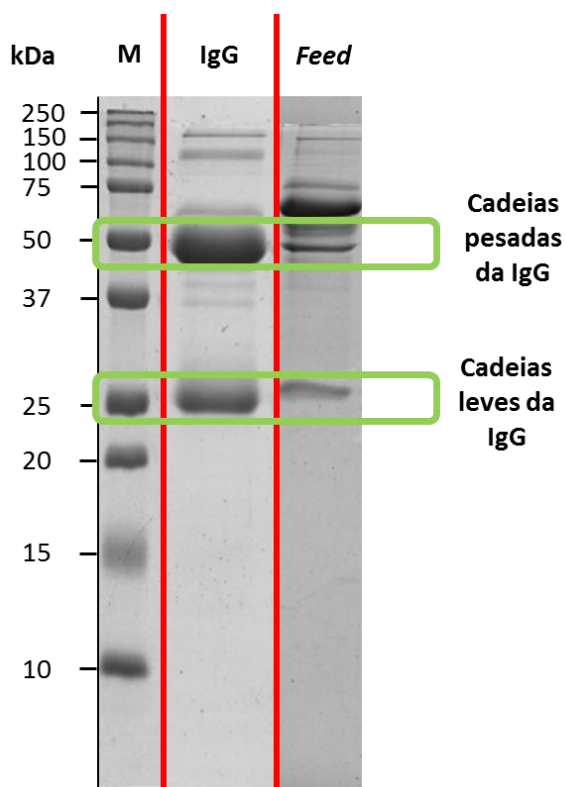


Figura 14 – SDS-PAGE de um gel 12% T e 3% C, corado com azul de Coomassie, carregado com as seguintes amostras: Poço 1 – marcador de peso molecular; Poço 2 – IgG pura Gammanorm 1 g/L; Poço 3 – sobrenadante proveniente de uma cultura celular CHO DP-12. A posição das cadeias pesadas (50 kDa) e das cadeias leves (25 kDa) da IgG encontram-se destacadas e indicadas na região à direita do gel.

Tal como foi referido anteriormente na secção 1.3.1. desta dissertação, os anticorpos são compostos por duas cadeias pesadas idênticas com aproximadamente 50 kDa cada, e duas cadeias leves idênticas com cerca de 25 kDa cada uma. Após a análise eletroforética da solução de IgG pura Gammanorm, representada no segundo poço do gel da Figura 14, é possível confirmar, de facto, a presença de duas bandas a esses pesos moleculares, referentes à IgG presente nessa solução.

No terceiro poço, correspondente ao sobrenadante de uma cultura celular CHO DP-12, produzido durante o processamento a montante dos anticorpos monoclonais, cujos resultados foram discutido na secção 3.1. deste documento, é possível uma vez mais constatar a presença de duas bandas a 50 kDa e 25 kDa referentes aos anticorpos anti-IL-8 produzidos e excretados pelas células em cultura. É ainda importante destacar uma outra banda com elevada intensidade, referente a uma proteína com um peso molecular de cerca de 70 kDa, sendo portanto, a impureza maioritária da IgG nos sobrenadantes das culturas celulares. A proteína em causa trata-se da albumina de soro bovina (BSA), cujo peso molecular é de 66,5 kDa, e de facto, a BSA é o componente maioritário do FBS suplementado no meio de cultura [135]. Para além disso existem várias outras impurezas proteicas igualmente presentes no sobrenadante, com pesos moleculares a variar entre, aproximadamente, 37 kDa e 150 kDa. Estas impurezas apresentam duas origens possíveis/prováveis. Em primeiro lugar, resultam da utilização do DMEM suplementado com FBS no meio de cultura, que para além da albumina também contém, por exemplo, insulina (peso molecular = 5,8 kDa) e transferrina (peso molecular = 80 kDa) que apresentam especial relevância ao nível do transporte de nutrientes e são facilitadoras do metabolismo celular [88, 89]. A segunda origem provável para estas impurezas refere-se às próprias células mantidas em cultura e são designadas de proteínas da célula hospedeira (HCP), que podem ser excretadas pela célula hospedeira para o meio extracelular, ou então podem ser libertadas para o sobrenadante através da lise celular [193].

Finalmente, uma vez que as características físicas/químicas intrínsecas às biomoléculas são predominantes no seu comportamento de partição num sistema aquoso bifásico [2], e em particular o pH desempenha uma enorme influência nesse comportamento, procedeu-se à determinação do ponto isoelectrico (pI) das proteínas presentes nas soluções *stock* em estudo. Na Figura 15 é possível observar o gel resultante da focagem isoelectrica (IEF) da solução de IgG pura Gammanorm e dos sobrenadantes das culturas celulares CHO DP-12.

Através da focagem isoelectrica apresentada na Figura 15 é possível constatar que a IgG pura Gammanorm não apresenta apenas um pI, mas sim uma gama de pontos isoelectricos que variam, de forma aproximada, entre 7 e 9,3. Isto acontece devido à natureza policlonal desta solução de IgG, que apresenta diferentes proporções de IgG1 / IgG2 / IgG3 / IgG4 na sua composição. Contrariamente à IgG Gammanorm, a IgG produzida pelas culturas celulares CHO DP-12 em estudo apresenta uma natureza monoclonal, uma vez que se trata especificamente de um anticorpo anti-IL-8. Nesse

sentido, no gel de IEF verifica-se a presença de apenas uma banda para este anticorpo, correspondente a apenas um valor de pI de aproximadamente 9,3.

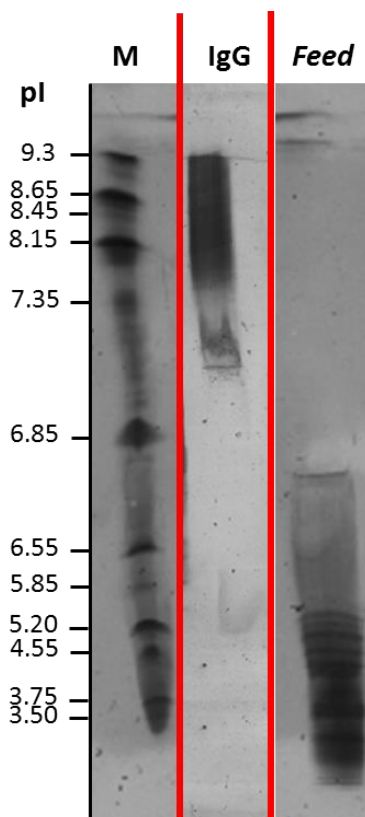


Figura 15 – Gel de focagem isoelétrica (IEF) 5% T e 3% C, corado com nitrato de prata e carregado com as seguintes amostras: Poço 1 – marcador de pontos isoelétricos; Poço 2 – IgG pura Gammanorm; Poço 3 – sobrenadante proveniente de uma cultura celular CHO DP-12.

De facto, o pI da anti-IL-8 produzida por culturas de células CHO DP-12 já havia sido reportado anteriormente na literatura [192], e efetivamente o valor de pI determinado neste estudo/condições permite corroborar o valor já publicado [192]. Assim sendo, uma vez que este anticorpo apenas apresenta um pI, é mais suscetível a alterações drásticas em termos de comportamento de partição nos SAB com pequenas variações de pH, nas condições de extração, do que a IgG Gammanorm, que por apresentar uma gama de pIs apresenta-se menos propícia a essas alterações drásticas na sua partição. Mais ainda, é possível constatar que as restantes proteínas presentes nos sobrenadantes das culturas celulares apresentam pIs acídicos, e em particular a albumina apresenta um pI de 4,7 [135], ao contrário da IgG anti-IL-8 que tem um pI básico, facto este que poderá apresentar-se vantajoso para efeitos de extração seletiva da anti-IL-8 ao nível do processamento a jusante.

Deste modo, foi então possível caracterizar as soluções *stock* contendo IgG, que foram posteriormente utilizadas na otimização do processo de purificação dos anticorpos.

Através da análise do seu perfil proteico foi possível concluir que, sempre que presente, a IgG apresenta duas bandas características a 50 kDa e 25 kDa, e ainda que a sua impureza proteica maioritária nos sobrenadantes das culturas celulares, a albumina, apresenta uma banda característica por volta dos 70 kDa. Mais ainda, no sentido de aprofundar a caracterização da biomolécula de interesse neste trabalho, foi também determinado o pI da IgG em ambas as soluções, concluindo-se que a IgG pura Gammanorm devido à sua natureza policlonal apresenta um espectro de pIs compreendido entre [7 – 9,3], enquanto que o anticorpo monoclonal IgG anti-IL-8 apresenta um pI de aproximadamente 9,3. Estas informações apresentam-se extremamente relevantes para uma melhor compreensão dos fenómenos inerentes ao processamento a jusante da IgG que foi estudado de seguida, permitindo ainda fornecer informações relativamente ao tipo de alterações que podem ser introduzidas nas condições de trabalho (nomeadamente em termos de pH e de força iónica) de forma a melhorar a extração da IgG e aumentar o nível de pureza da proteína.

3.3. Sistemas quaternários PEG + Fosfato + H₂O + LI

A primeira etapa relativa ao estudo do processamento a jusante dos anticorpos por meio de SAB consistiu na pesquisa de novos sistemas compreendendo a integração de LIs, passíveis de serem explorados na partição seletiva da IgG. Nesse sentido, tornou-se intuitiva a exploração inicial de SAB do tipo polímero-sal, uma vez que se trata de um tipo de sistemas bastante viáveis e preferenciais considerando a sua aplicação a nível industrial, essencialmente devido aos reduzidos custos associados à utilização de sais inorgânicos convencionais, baixa viscosidade, reduzido tempo de separação das fases coexistentes e a possibilidade de reciclar ambos os componentes (o polímero e o sal) [2].

O polímero adotado para este trabalho foi o PEG 3350, um polímero não-carregado que apresenta inúmeras vantagens na sua utilização em processos que envolvam proteínas, uma vez que apresenta um efeito estabilizador da conformação das mesmas [139], aliado a uma baixa toxicidade, fácil manuseamento e ao facto de ser relativamente acessível em termos económicos [194]. A solução salina consistiu numa solução tampão de fosfato originada a partir de K₂HPO₄/NaH₂PO₄, uma vez que se tratam de sais pouco dispendiosos e que nos permitem obter um sistema tamponizado, mantendo-o ao pH fisiológico (de aproximadamente 7). Relativamente aos LIs a utilizar como adjuvantes nestes sistemas, a estratégia utilizada para a sua seleção passou pela utilização de LIs de

diferentes famílias, com o anião cloreto (Cl^-) em comum, uma vez que este já foi introduzido com sucesso neste tipo de sistemas, sob a forma de NaCl , tendo levado à obtenção de resultados promissores em termos de aumento de seletividade [135]. Neste sentido, foram então selecionados dois diferentes LIs: um LI da família dos imidazólios – $[\text{C}_4\text{mim}]\text{Cl}$ – e um LI derivado da família dos amónios – $[\text{N}_{1111}]\text{Cl}$.

Posto isto, foram então desenvolvidos ensaios de otimização do processo de extração de IgG a partir de uma solução *stock* de IgG pura com uma concentração de 1 g/L, utilizando este tipo de sistemas quaternários. Em todas as condições testadas, a concentração de PEG e de fosfato do ponto de mistura foram mantidas em comum, tendo sido estudadas três concentrações diferentes de cada LI, nomeadamente 1, 5 e 10%. Neste sentido, os pontos de mistura selecionados para a extração de IgG pura Gammanorm encontram-se apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Pontos de mistura estudados com vista à extração de IgG com o sistema ternário controlo PEG 3350 + fosfato + H_2O e com os sistemas quaternários PEG 3350 + fosfato + H_2O + LI.

LI	[PEG] % (m/m)	[Fosfato] % (m/m)	[Solução IgG] % (m/m)	[LI] % (m/m)	[H_2O] % (m/m)
Sistema ternário PEG 3350 + fosfato + solução <i>stock</i> IgG					
×	12	10	30	-	48
Sistema quaternário PEG 3350 + fosfato + LI + solução <i>stock</i> IgG					
[C_4mim] Cl [N_{1111}] Cl	12	10	30	1	47
				5	43
				10	38

Na Figura 16, pode observar-se o aspeto macroscópico dos sistemas de extração com a composição descrita na Tabela 5. Tal como se pode constatar através da análise da imagem, não se verificou a formação de qualquer fase sólida de proteína precipitada e/ou desnaturada. Deste modo, em todos os sistemas estudados foi possível a partição de IgG pelas duas fases aquosas, pelo que todos estes SAB foram utilizados nas análises subsequentes.

Um aspeto importante a referir, é o facto de a razão volumétrica do sistema alterar-se com o aumento da concentração de LI adicionado, e que aparenta ser altamente dependente do LI utilizado. De facto, no que concerne ao $[\text{C}_4\text{mim}]\text{Cl}$, é possível constatar um aumento gradual da fase superior do sistema à medida que a concentração de LI no sistema aumenta, chegando esta fase a representar mais do dobro do volume da fase inferior correspondente.

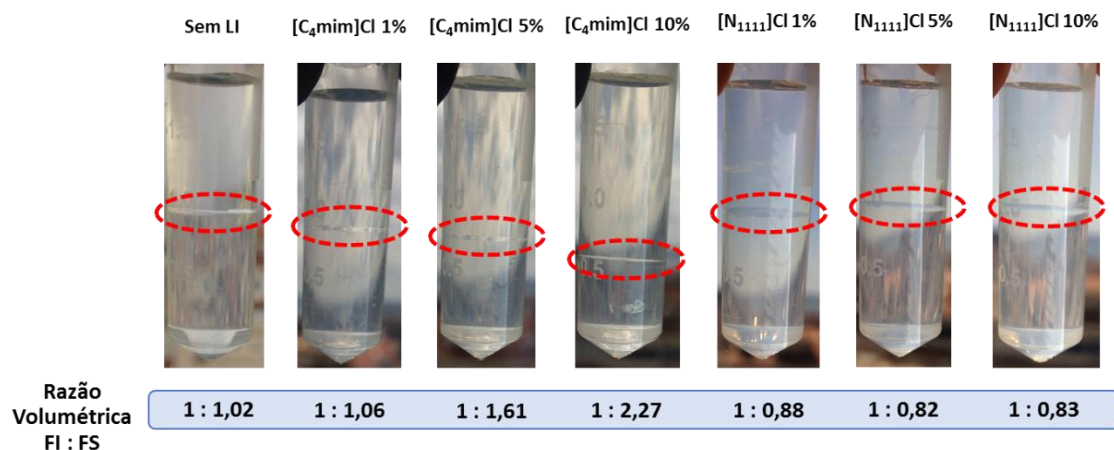


Figura 16 – Aspeto macroscópico dos sistemas PEG + fosfato + H₂O, com diferentes concentrações de LI como adjuvante, que permitiram a formação de SAB apropriados à partição da IgG. A razão volumétrica das fases coexistentes (fase inferior – FI; fase superior – FS) encontra-se indicada na barra azul, e a interface do sistema encontra-se realçada com um círculo descontinuo vermelho.

O comportamento oposto é verificado para o sistema com [N₁₁₁₁]Cl, no qual se constata um aumento do volume da fase inferior na presença de LI quando comparado com o sistema controlo (sem LI). No entanto, o aumento da concentração de LI neste caso não aparenta ter uma grande influência na alteração da razão volumétrica do sistema, o que indicia que a estrutura e natureza química do LI tem uma maior relevância do que a sua concentração. Estas observações sugerem que a adição de LIs ao sistema PEG + fosfato promove a alteração do equilíbrio termodinâmico do sistema, induzindo a alteração do próprio diagrama de fases. Este comportamento encontra-se concordante com investigações anteriores já reportadas na literatura [14], dado que nesse trabalho, a adição de pequenas quantidades de LIs derivados do catião imidazólio a sistemas polímero-sal, promoveram alterações substanciais na curva binodal do sistema, aumentando a sua capacidade de formação de SAB. Naturalmente que a alteração do diagrama de fases acarreta consigo a alteração da *tie-line* em que o ponto de mistura em estudo se insere, e consequentemente a composição das fases superior e inferior do sistema também será diferente em cada situação.

Após a separação de ambas as fases aquosas coexistentes dos sistemas de extração, foi estudado o comportamento de partição da IgG no sistema controlo sem LI e nos sistemas com diferentes concentrações de LI (1, 5 e 10%), no sentido de avaliar a sua eficiência no que concerne à extração seletiva da IgG para a fase superior rica em PEG de cada sistema. Os dados obtidos para os rendimentos de extração e eficiências de extração, bem como os respetivos desvios-padrão encontram-se representados na Figura 17, e os coeficientes de partição com os desvios-padrão inerentes encontram-se representados na

Figura 18. Investigou-se ainda os valores de pH de cada fase do sistema, uma vez que se trata de um parâmetro extremamente relevante na partição das biomoléculas em SAB, encontrando-se esses resultados igualmente representados em cada um dos gráficos.

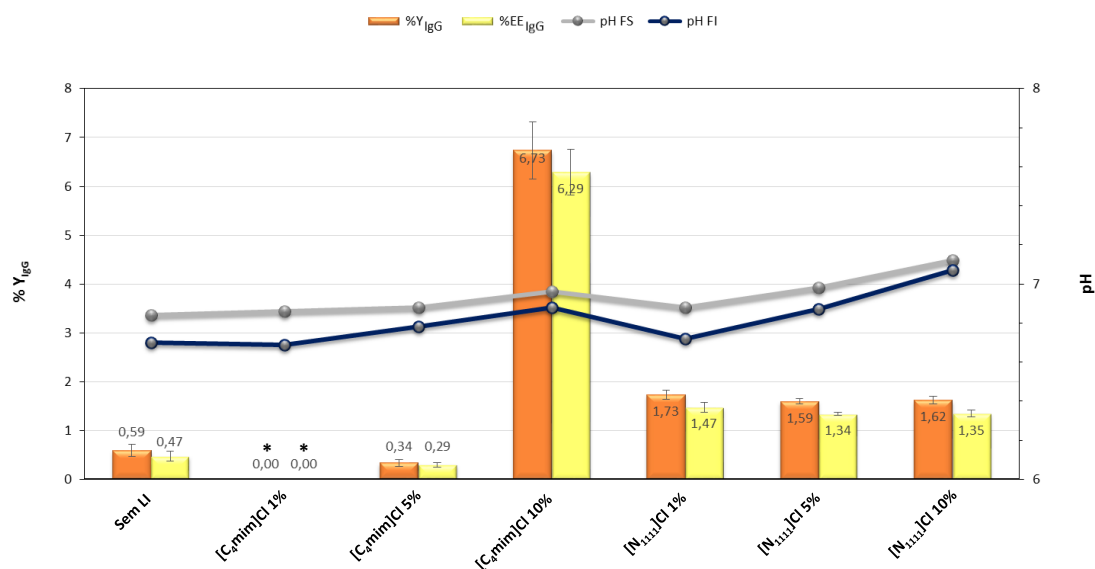


Figura 17 – Rendimentos de extração e eficiências de extração da IgG nos SAB quaternários PEG + fosfato + H₂O + LIs em estudo, e respectivos valores de pH na fase superior (FS) e na fase inferior (FI). * significa que o rendimento e eficiência de extração de IgG para a FS é negligenciável, e portanto, impossível de ser determinada experimentalmente.

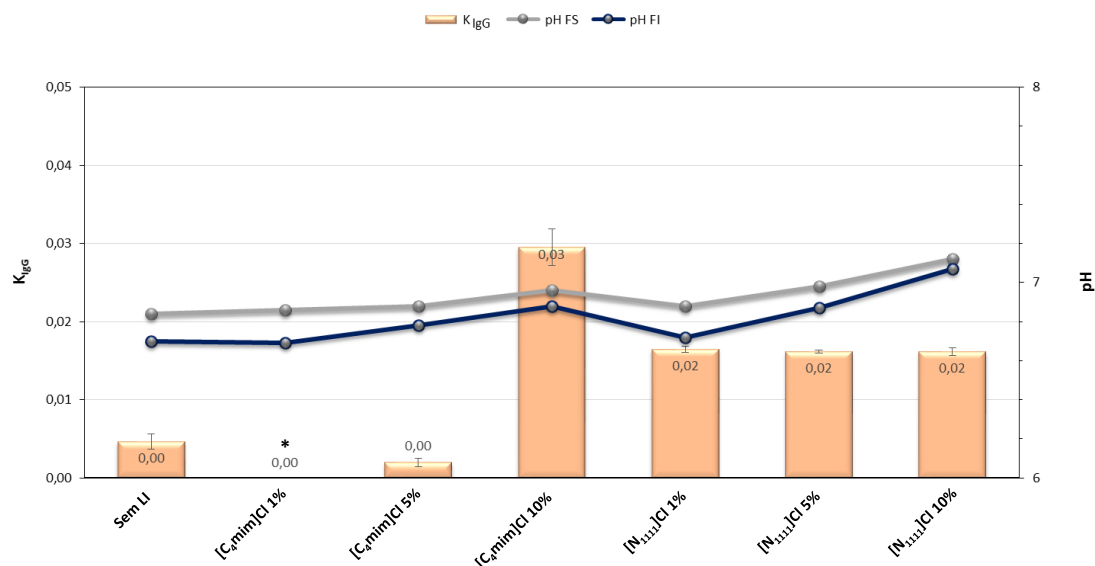


Figura 18 – Coeficientes de partição da IgG nos SAB quaternários PEG + fosfato + H₂O + LIs em estudo, e respectivos valores de pH na fase superior (FS) e na fase inferior (FI). * significa que a quantidade de IgG que particiona para a FS é negligenciável, e portanto, impossível de ser determinada experimentalmente.

Tal como se pode constatar através da análise da Figura 17, de uma forma geral, atingiram-se rendimentos de extração da proteína até 6,73% para fase rica em PEG. Este

valor máximo de extração foi obtido para o sistema contendo 10% de [C₄mim]Cl, sendo que o menor rendimento de extração foi verificado igualmente para o mesmo LI numa concentração de 1%. Mais ainda, é possível constatar uma concordância entre os rendimentos de extração e as eficiências de extração de todos os sistemas em estudo, dado que se obtiveram valores próximos para ambos os parâmetros e que, individualmente, representam a mesma tendência relativa à extração da IgG para a fase superior. Para além disso, o coeficiente de partição da IgG para a fase superior variou entre 0,00 e aproximadamente 0,03. Assim sendo, é possível concluir que, uma vez que o coeficiente de partição é muito menor que 1 em todas as condições estudadas, a IgG particiona-se preferencialmente para a fase inferior dos sistemas – a fase rica em fosfato – sendo esta informação reiterada pelos baixos rendimentos de extração/eficiências de extração relativamente à fase superior dos sistemas. Um parâmetro que também é importante ser referido, é o pH a que este estudo foi conduzido, que variou nas próprias fases dos vários sistemas entre, sensivelmente, 6,7 e 7,1, apesar de se ter adicionado o tampão fosfato a pH 7 como constituinte do SAB. O facto de se utilizar este tampão de fosfato como *phase-forming compound* demonstra-se essencial para que não se atinjam valores superiores ao pI da proteína de interesse (IgG) que possui o seu pI à volta de 9 como foi discutido no capítulo anterior, e simultaneamente não se atinjam valores inferiores ao pI das principais impurezas proteicas, que são de uma forma geral mais acídicos, de forma que a proteína de interesse e as restantes impurezas apresentem cargas opostas (positiva e negativa, respetivamente). No entanto, a presença de LIs leva a ligeiras oscilações do pH devido à presença de grupos dadores e aceitadores de protões nas suas estruturas químicas.

Através da análise integrada dos resultados para os dois LIs em estudo, é possível constatar um comportamento/tendência diferente para cada uma das situações, e que é interessante ser explorado. No que diz respeito ao [C₄mim]Cl, com a adição de apenas 1% de LI, a concentração de IgG na fase superior do sistema encontra-se abaixo do limite de deteção do próprio método de quantificação, o que significa que a sua presença nesta fase é negligenciável. Este fenómeno encontra-se em concordância com o valor do coeficiente de partição obtido, o que significa que a totalidade da proteína migra para a fase inferior rica em fosfato. Com a adição de 5% de LI, embora seja possível extrair 0,34% da proteína, este valor continua aquém dos 0,59% de IgG extraído com o sistema controlo (sem adição de LI). Surpreendentemente, apenas com 10% deste LI é possível constatar uma melhoria considerável em termos de rendimento de extração comparativamente com o sistema controlo, traduzindo-se esta situação num consequente

aumento do coeficiente de partição. No que diz respeito ao $[N_{1111}]\text{Cl}$, é possível verificar que, em todas as concentrações estudadas, o rendimento de extração manteve-se aproximadamente constante, oscilando apenas entre 1,59% e 1,73% (valores que se encontram dentro do erro experimental associado às medições). Tal situação traduz-se ainda num coeficiente de partição de aproximadamente 0,02 para todas as condições estudadas. Deste modo, é possível concluir que no caso do $[N_{1111}]\text{Cl}$ a estrutura química do próprio LI aparenta ter a maior influência no que concerne à manipulação da afinidade da IgG para a fase superior, não sendo relevante a quantidade de LI adicionado ao sistema uma vez que se obtiveram rendimentos de extração comparáveis em todas as situações. Contudo, o efeito do $[C_4\text{mim}]\text{Cl}$ parece ser mais dependente da sua concentração no sistema do que da sua estrutura química, uma vez que com baixas concentrações do LI a quantidade de proteína na fase superior do sistema é negligenciável, e apenas com a adição de 10% deste LI se consegue manipular favoravelmente a partição da IgG. Tal como havia sido referido anteriormente, após a análise da Figura 16, a fase superior dos sistemas com $[N_{1111}]\text{Cl}$ é sempre menor que a fase inferior, mesmo com a concentração mais baixa de LI testada, o que significa que se obtém sempre uma fase superior rica em PEG mais concentrada, e consequentemente mais hidrofóbica. A IgG trata-se de uma proteína com um carácter hidrofóbico, resultante do facto de 14% dos átomos de superfície corresponderem a resíduos hidrofóbicos, e ainda do facto de se tratar de uma proteína grande, com uma elevada massa molecular, que torna o seu carácter hidrofóbico ainda mais pronunciado [135]. Deste modo, o aumento do rendimento de extração da IgG para a fase superior nos sistemas com este LI pode ser resultado essencialmente de interações hidrofóbicas e eletrostáticas que se estabelecem entre a proteína e os componentes da fase superior do sistema. No caso do $[C_4\text{mim}]\text{Cl}$, o aumento do rendimento de extração da IgG para a fase superior relativamente ao sistema controlo é possivelmente devido ao estabelecimento de interações eletrostáticas e interações $\pi\cdots\pi$ entre o anel aromático do catião do LI em questão e os aminoácidos aromáticos presentes na estrutura primária da IgG. Uma vez que se tratam de interações diretamente realizadas entre o LI e a proteína, estas permitem justificar que apenas com a condição em que existe maior quantidade de LI no sistema é possível obter um aumento considerável ao nível do rendimento/eficiência de extração, sendo esse aumento ainda superior ao verificado para o outro LI em estudo.

Apesar de ter sido possível melhorar/aumentar a partição da IgG para a fase superior em determinadas condições/sistemas estudados neste capítulo, não foram obtidos

resultados promissores o suficiente que permitissem avançar com o estudo deste tipo de sistemas constituídos por outros LIs, ou mesmo testar a sua capacidade de extração de purificação de IgG a partir da matriz real (sobrenadantes das culturas celulares). Apesar de os SAB do tipo polímero-sal já se terem revelado seletivos para a IgG, através da adição de um eletrólito ao sistema (15% de NaCl) [135], no estudo aqui conduzido não foi possível demonstrar a mesma potencialidade com a utilização de LIs. De facto, uma vez que os LIs são constituídos por um catião orgânico de elevadas dimensões, há uma maior dispersão da carga iónica, comparativamente com os sais inorgânicos convencionais. Assim, visto que os sistemas em estudo são caracterizados pela presença de uma fase inferior salina, a adição dos LIs (que apresentam uma maior dispersão da carga) tem uma menor força capaz de induzir uma manipulação significativa da partição da IgG num sistema com um conteúdo elevado de sais convencionais, que apresentam a carga do catião concentrada num ião inorgânico de menores dimensões. Provavelmente, apenas com concentrações extremamente elevadas de LI é que seria possível constatar um efeito notório em termos de aumento de seletividade para a fase rica em PEG. Por tudo isto, não se prosseguiu com o estudo destes SAB, não tendo sido utilizados em análises subsequentes.

3.4. Sistemas quaternários PEG + Dextrano + H₂O + LI

Uma vez que os SAB polímero-sal, em particular os constituídos por PEG + fosfato, não se revelaram adequados para a extração de IgG, tal como discutido na secção 3.3. desta dissertação, e tendo em consideração os problemas ambientais inerentes à utilização de sais de fosfato, o foco deste estudo voltou-se então para um outro tipo maioritário de SAB: os SAB polímero-polímero. Para este efeito, foram estudados SAB constituídos por dois polímeros diferentes – PEG e dextrano – uma vez que se tratam dos componentes mais utilizados nas separações bioquímicas envolvendo duas fases aquosas. Assim, a estratégia passou por efetuar-se um estudo alargado de vários LIs de diferentes famílias, utilizando-os como adjuvantes neste tipo de sistemas polímero-polímero, no sentido de estudar o seu efeito na manipulação do comportamento de partição da IgG neste sistemas.

3.4.1. Caracterização do sistema em estudo

Uma vez selecionados os componentes que definem os SAB em estudo, procedeu-se inicialmente à obtenção do diagrama de fases do sistema ternário de referência PEG 3350

+ dextrano 500 kDa + H₂O, seguindo a estratégia prática de desenvolvimento de um processo de extração baseado em SAB descrita na literatura [2]. A obtenção do diagrama de fases deste sistema é de extrema relevância, uma vez que nos permite avaliar a influência dos diferentes parâmetros do sistema na capacidade de formação de duas fases aquosas. Embora já se encontre reportado na literatura o diagrama de fases de um sistema semelhante, diferindo apenas ligeiramente no peso molecular do PEG, que é de 3400 Da, torna-se importante caracterizar e definir o sistema nas condições de trabalho em que este foi desenvolvido, uma vez que as mais pequenas diferenças, por exemplo em termos de temperatura e do peso molecular e/ou pureza dos reagentes, levam a ligeiras alterações do diagrama. Assim, para além de caracterizarmos o sistema adequadamente, também é possível discriminar a composição exata de cada uma das fases que constituem o SAB de extração, através da determinação da TL do ponto de mistura, para além da vantagem adicional de nos permitir ter o sistema muito bem determinado experimentalmente (com muitos pontos experimentais a definirem a curva binodal), tratando-se de um requisito indispensável para uma eventual e posterior concentração da fase superior do sistema através da manipulação do ponto de mistura ao longo de uma determinada TL de extração.

Posto isto, foi então determinado o diagrama de fases dos polímeros em estudo, PEG 3350 com dextrano 500 kDa e água, a 25 °C (± 1 °C), à pressão atmosférica e sem controlo de pH. O respetivo diagrama de fases deste sistema ternário encontra-se representado na Figura 19, e os dados experimentais das frações mássicas encontram-se apresentados no Anexo E (Tabela E.1). No sistema em estudo, a fase de topo corresponde à fase aquosa rica em PEG, enquanto que a fase de baixo é maioritariamente constituída por dextrano. Na Figura 6, a curva binodal é apresentada em unidades de fração mássica, para que haja um melhor entendimento da sua apetência para formar sistemas do tipo líquido-líquido com vista à sua aplicação do ponto de vista biotecnológico. Para o sistema em estudo, os dados experimentais da curva binodal foram ajustados pela Equação de Merchuk (Equação 7), os parâmetros da regressão foram estimados pelo método da regressão dos mínimos quadrados, e os seus valores e correspondentes desvios-padrão (σ) estão apresentados na Tabela 6. O coeficiente de correlação para o sistema em estudo apresenta-se ligeiramente inferior ao que seria pretendido, devido à elevada viscosidade dos polímeros em estudo, que dificultam e induzem a introdução de erros essencialmente associados às pesagens. Apesar disso, foi possível efetuar um ajuste aos dados experimentais, e esta mesma correlação pode ser utilizada para prever os dados de uma dada região do diagrama de fase da qual não existem resultados experimentais

disponíveis. Mais ainda, os dados das *tie-lines* experimentais (TLs) e os respectivos comprimentos de *tie-line* (TLLs) encontram-se descritos na Tabela 7, e estas encontram-se igualmente representadas na Figura 19. De um modo geral, as TLs são aproximadamente paralelas, como seria expectável.

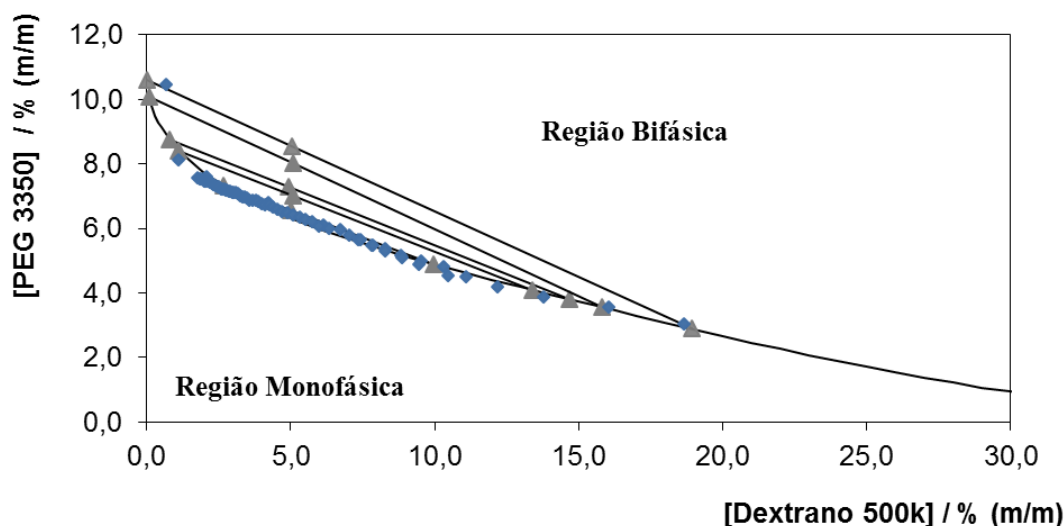


Figura 19 – Diagrama de fases do sistema ternário constituído por PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H₂O, a 25 °C (± 1 °C), à pressão atmosférica e ao pH do sistema: curva binodal (♦); TLs (▲); ajuste da curva binodal pela Equação 7 (-).

Tabela 6 – Parâmetros de correlação utilizados para descrever os dados experimentais da curva binodal pela Equação de Merchuk.

Sistema	A $\pm \sigma$	B $\pm \sigma$	C $\pm \sigma (\times 10^{-5})$	R ²
PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H ₂ O	10,79 \pm 0,21	-0,237 \pm 0,011	4,22 \pm 1,16	0,9609

Tabela 7 – Dados experimentais das TLs e TLLs para o sistema PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H₂O.

Sistema	Composição em termos de frações mássicas (% (m/m))						TLL
	[PEG]	[dextrano]	[PEG]	[dextrano]	[PEG]	[dextrano]	
	PEG	PEG	M	M	dextrano	dextrano	
PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H ₂ O	7,32	2,67	6,55	4,99	4,89	9,97	7,69
	8,76	0,77	7,28	4,92	3,81	14,67	14,76
	8,81	1,10	7,01	5,09	4,10	13,37	13,00
	10,08	0,08	8,01	5,06	3,56	15,81	17,03
	10,60	0,01	8,54	5,05	2,89	18,92	20,43

Finalmente, procedeu-se à tentativa de determinar o diagrama de fases dos sistemas derivados de LIs, constituídos por LI e por cada um dos polímeros em estudo, PEG 3350 + LI + H₂O e dextrano 500 kDa + LI + H₂O, a 25 °C (± 1 °C), à pressão atmosférica e sem controlo de pH. Para tal, estudou-se a capacidade do [C₄mim]Br formar SAB com cada um destes polímeros isoladamente, uma vez que se trata de um LI bastante hidrofóbico pois é constituído por um catião aromático com duas cadeia alquílicas, e pelo anião Br⁻ que apresenta um menor valor de basicidade de ligação de hidrogénio (parâmetro β) comparativamente com o anião Cl⁻ amplamente estudado neste trabalho. O parâmetro β dos LIs é um parâmetro solvatocrómico que define a capacidade de um dado LI aceitar protões, e encontra-se fortemente dependente do anião que constitui o mesmo. Desta maneira, este fator reflete a capacidade do anião de um LI para aceitar protões e estabelecer pontes de hidrogénio. Neste sentido, os aniões que apresentam valores de β menores, apresentam menos sítios recetores de protões e consequentemente apresentam menor capacidade de estabelecer pontes de hidrogénio com a água, pelo que permitem mais facilmente a formação de SAB. De facto, o valor dos β é maioritariamente dependente do anião do LI, e para os LIs derivados do catião 1-butil-3-metil-imidazólio estes seguem o seguinte *ranking*: Cl⁻ (0,95) > Br⁻ (0,87) [195]. Assim, o anião Br⁻ é o mais hidrofóbico uma vez que apresenta o menor valor do parâmetro β . Para além disso, foi demonstrado anteriormente que é a hidrofobicidade do anião LI ou a sua capacidade de formar pontes de hidrogénio com a água que controla a formação de SAB [172]. Contudo, não foi possível formar os sistemas constituídos por PEG 3350 + [C₄mim]Br + H₂O nem por dextrano 500 kDa + [C₄mim]Br + H₂O, sendo possível concluir que não é possível estabelecer SAB compostos por LIs e pelos polímeros em estudo isoladamente.

3.4.2. Extração de IgG pura/comercial

Após a definição/caracterização do SAB de referência nas condições de trabalho, foram iniciados os ensaios de otimização do processo de extração de IgG a partir de uma solução *stock* de IgG pura/comercial com uma concentração de 1 g/L, utilizando este tipo de sistemas polímero-polímero com a presença de LIs como adjuvantes. Em todas as condições testadas, a concentração de PEG e de dextrano do ponto de mistura foram mantidas em comum, de forma a apenas avaliar o efeito das diferentes concentrações de LI em cada sistema, evitando discrepâncias nos rendimentos de extração resultantes das diferenças em termos da composição em polímeros entre sistemas. Foram estudadas três

concentrações diferentes de diferentes LIs, nomeadamente 1, 5 e 10%, sendo que os pontos de mistura selecionados para a extração de IgG pura Gammanorm encontram-se apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Pontos de mistura estudados com vista à extração de IgG com o sistema ternário controlo PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H₂O e com os sistemas quaternários PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H₂O + LI.

LI	[PEG] % (m/m)	[dextrano] % (m/m)	[Solução IgG] % (m/m)	[LI] % (m/m)	[H ₂ O] % (m/m)
Sistema ternário PEG 3350 + dextrano 500 kDa + solução <i>stock</i> IgG					
×	7	5	30	-	58
Sistema quaternário PEG 3350 + dextrano 500 kDa + LI + solução <i>stock</i> IgG					
[N ₁₁₁₁]Cl [N ₄₄₄₄]Cl [P ₄₄₄₄]Cl [C ₄ -4mpy]Cl [Ch]Cl [Ch]Ac [C ₄ mim]Cl [C ₄ mim][HSO ₄] [C ₄ mim]Br	7	5	30	1 5 10	57 53 48

Na Figura 20, pode observar-se o aspeto macroscópico dos sistemas de extração com a composição descrita na Tabela 8. Tal como se pode verificar através da análise da imagem, de uma forma geral não se verificou a formação de qualquer fase sólida de proteína precipitada e/ou desnaturada que impedisse a partição de IgG pelas duas fases aquosas. Contudo, é importante destacar a formação de uma camada sólida intermédia de proteína precipitada nos sistemas com 10% de [P₄₄₄₄]Cl e com 1%, 5% e 10% de [C₄mim][HSO₄], sendo que com este último LI, em todas as condições verifica-se também o aparecimento de alguns depósitos de proteína precipitada no topo e no fundo do eppendorf. Assim, mesmo sendo possível prever que estas condições não sejam apropriadas para a extração e posterior purificação de IgG, uma vez se verificou a formação de duas fases aquosas, estes sistemas não foram descartados nesta etapa e prosseguiu-se com a sua utilização no processo de otimização dos sistemas de extração líquido-líquido. Deste modo, uma vez que em todos os sistemas estudados foi possível a partição de IgG pelas duas fases aquosas, todos os SAB representados na Figura 20 foram utilizados nas análises subsequentes.

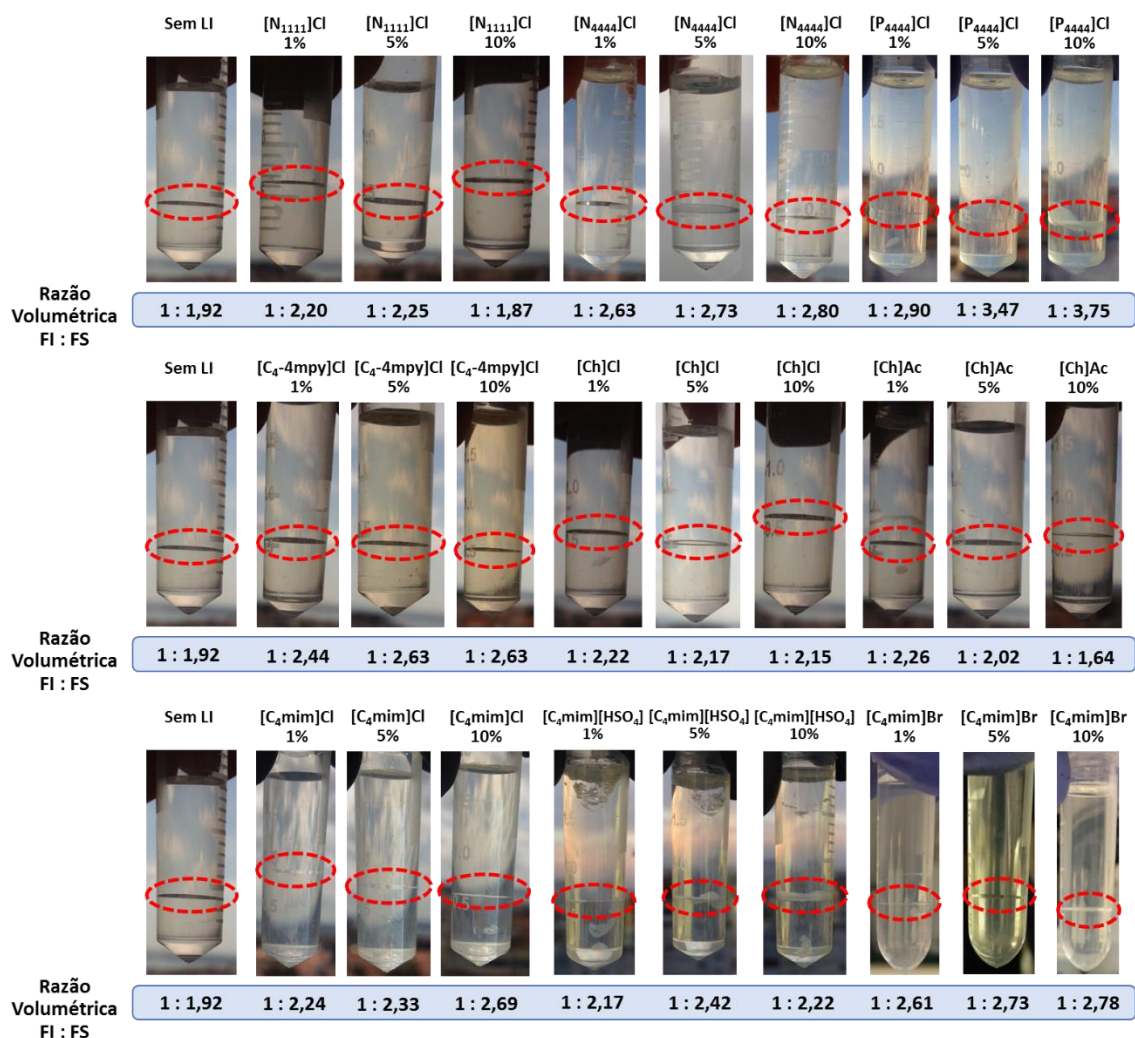


Figura 20 – Aspeto macroscópico dos sistemas PEG + dextrano + H₂O, com diferentes concentrações de LI como adjuvante, que permitiram a formação de SAB apropriados à partição da IgG. A razão volumétrica das fases coexistentes (fase inferior – FI; fase superior – FS) encontra-se indicada na barra azul, e a interface do sistema encontra-se realçada com um círculo descontinuo vermelho.

Um aspeto importante a referir, é o facto de, uma vez mais, a razão volumétrica do sistema alterar-se com a adição de LI, e que aparenta ser altamente dependente do LI utilizado e da sua concentração. Estas observações encontram-se de acordo com as descritas no capítulo anterior, provando que a adição de pequenas quantidades de LI a SAB constituídos por dois polímeros também promove uma alteração do equilíbrio de fases. Mais ainda, é possível constatar que foi possível formar sistemas de duas fases aquosas com todos os LIs nas diferentes concentrações testadas. Uma vez que não é possível formar SAB ternários constituídos apenas por LI e pelos polímeros isolados (isto é, sistemas PEG 3350 + LI + H₂O ou por dextrano 500 kDa + LI + H₂O) como discutido anteriormente, torna-se extremamente vantajosa a utilização dos LIs como adjuvantes nos sistemas convencionais PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H₂O, uma vez que foi possível

formar este tipo de sistemas quaternários utilizando os LIs como adjuvantes, incluindo assim nestes sistemas as vantagens intrínsecas dos LIs, que de outra forma não poderiam ser aproveitadas com a utilização destes polímeros.

3.4.2.1. Efeito do catião do LI

Inicialmente, o efeito da adição de LIs com diferentes catiões ao SAB polímero-polímero para a partição de IgG foi determinado utilizando LIs com o anião cloreto (Cl^-) fixo em comum entre todos eles, combinado com os seguintes catiões: $[\text{Ch}]^+$, $[\text{C}_4\text{mim}]^+$, $[\text{P}_{4444}]^+$, $[\text{C}_4\text{-4mpy}]^+$, $[\text{N}_{1111}]^+$ e $[\text{N}_{4444}]^+$. Para tal, todos os LIs foram adicionados a 1% (m/m) ao sistema PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H_2O , permitindo assim inferir acerca do efeito do núcleo do catião e do comprimento das cadeias laterais alquílicas dos LIs no comportamento de partição da IgG.

Os dados obtidos para os rendimentos de extração e coeficientes de partição, com indicação dos respetivos desvios-padrão encontram-se representados na Figura 21 e na Figura 22, respetivamente.

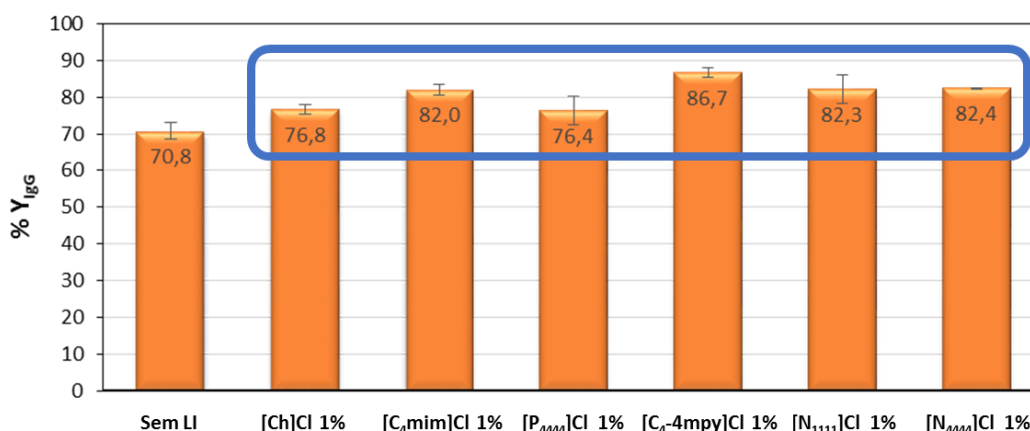


Figura 21 – Rendimentos de extração da IgG (% Y_{IgG}) nos SAB quaternários formados por PEG + dextrano + H_2O + 1% de diferentes LIs derivados do anião cloreto.

Tal como é possível verificar através da análise da Figura 21, em todos os casos estudados, a adição de uma pequena quantidade de LI (apenas 1%) permite manipular e aumentar a extração de IgG para a fase superior rica em PEG. Assim, o rendimento de extração de IgG dos vários SAB decresce na seguinte ordem de catiões dos LIs: $[\text{C}_4\text{-4mpy}]^+ > [\text{N}_{4444}]^+ \approx [\text{N}_{1111}]^+ \approx [\text{C}_4\text{mim}]^+ > [\text{Ch}]^+ \approx [\text{P}_{4444}]^+$. O LI derivado do catião piridínio apresenta-se assim como o LI que permite a obtenção de maiores rendimentos de extração de IgG para a fase superior. Pelo contrário, os derivados da colina e do

fosfónio levaram aos resultados menos promissores em termos de rendimentos de extração. Para além disso, é possível denotar diferentes apetências para a extração de IgG para a fase rica em PEG por parte dos tetra-alquilamónios e do tetra-alquilfosfónio, uma vez que os amónios apresentam uma maior apetência do que o fosfónio. Assim, podemos concluir que o átomo central do catião aparenta ter alguma influência no processo de extração. No entanto, não se verificam diferenças substanciais em função do comprimento da cadeia alquílica lateral (de metil para butil) entre os tetra-alquilamónios estudados. Estes resultados permitem concluir que as interações dispersivas ocorridas entre os catiões do LI e os grupos alquílicos orientados para o exterior da proteína não são relevantes para a partição de IgG.

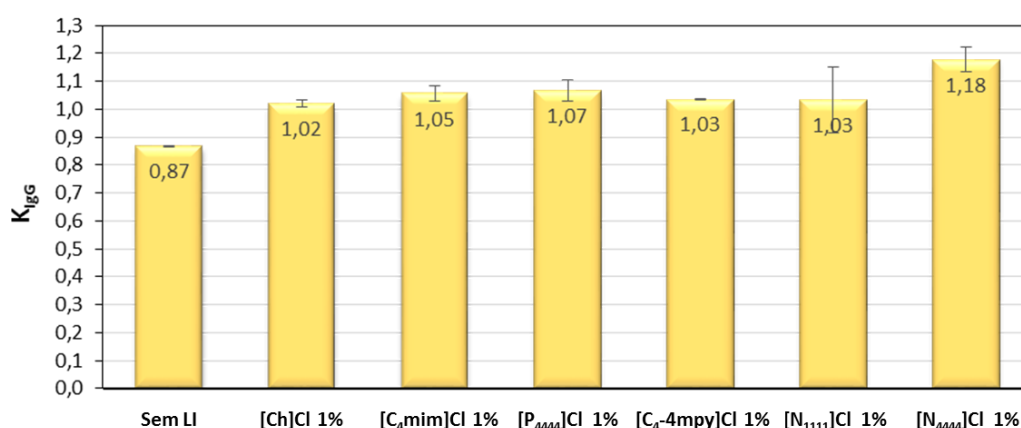


Figura 22 – Coeficientes de partição da IgG (K_{IgG}) nos SAB quaternários formados por PEG + dextrano + H₂O + 1% de diferentes LIs derivados do anião cloreto.

Os coeficientes de partição da proteína nos sistemas apresentados na Figura 22 também refletem, de uma forma geral, este comportamento, uma vez que no sistema controlo sem adição de LI o valor de K é inferior, indicando que a proteína migra preferencialmente para a fase inferior do sistema, rica em dextrano, e com a adição de LI verifica-se não só um aumento deste coeficiente de partição como uma inversão do comportamento de partição da biomolécula, uma vez que, para todos os casos, o valor de K é ligeiramente superior a 1, o que indicia uma partição preferencial da IgG para a fase superior do sistema, a fase rica em PEG. De facto, no sistema controlo, em que não há adição de LI, a fase rica em PEG é a fase mais hidrofóbica, pelo que as proteínas (incluindo a IgG) que são biomoléculas hidrofílicas, apresentam uma maior afinidade para a fase mais hidrofílica, que é neste caso a fase rica em dextrano. Com a adição de uma pequena quantidade de LI há efetivamente uma manipulação em termos da polaridade das fases que aparenta ter uma grande influência no comportamento de partição da proteína.

3.4.2.2. Efeito do anião do LI

Seguidamente, foi avaliado efeito da adição de LIs com diferentes aniões ao SAB polímero-polímero original, de modo a avaliar o efeito da natureza do LI na extração de IgG. Para tal, o estudo foi conduzido com LIs constituído pelo catião $[\text{Ch}]^+$ combinado com os aniões Cl^- e $[\text{Ac}]^-$, e ainda por LIs constituídos pelo catião $[\text{C}_4\text{mim}]^+$ combinado com os aniões Cl^- , Br^- e $[\text{HSO}_4]^-$. Todos os LIs foram adicionados a 1% (m/m) ao sistema PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H_2O , permitindo assim inferir acerca do efeito dos diferentes aniões no comportamento de partição da IgG.

Os dados obtidos para os rendimentos de extração e coeficientes de partição, com indicação dos respetivos desvios-padrão encontram-se representados na Figura 23 e na Figura 24, respetivamente.

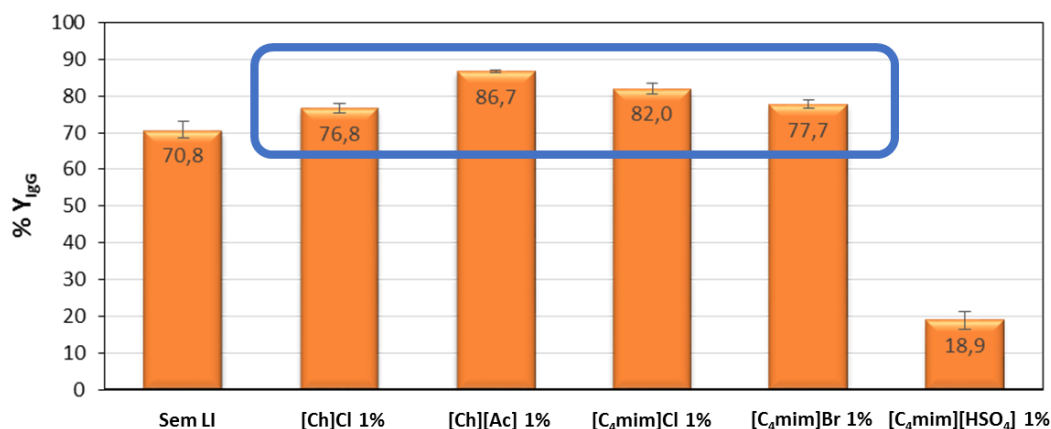


Figura 23 – Rendimentos de extração da IgG ($\% Y_{\text{IgG}}$) nos SAB quaternários formados por PEG + dextrano + H_2O + 1% de diferentes LIs derivados dos catiões $[\text{Ch}]^+$ e $[\text{C}_4\text{mim}]^+$.

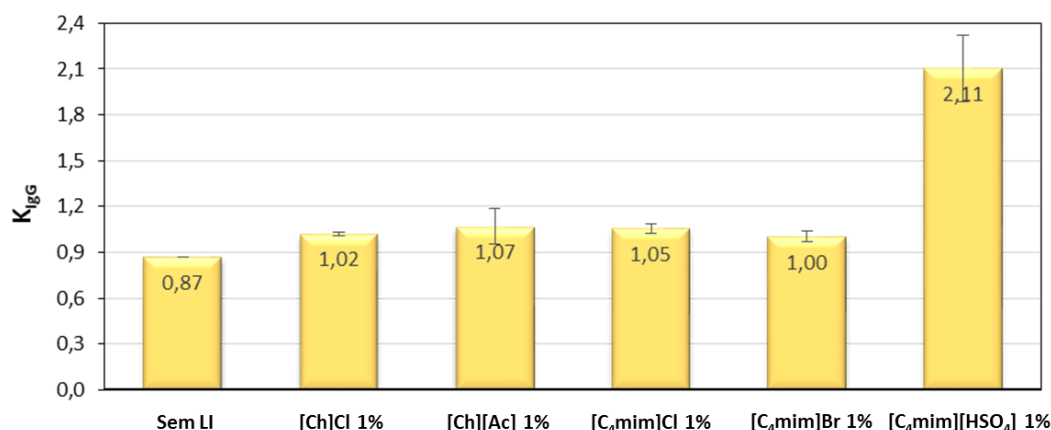


Figura 24 – Coeficientes de partição da IgG (K_{IgG}) nos SAB quaternários formados por PEG + dextrano + H_2O + 1% de diferentes LIs derivados dos catiões $[\text{Ch}]^+$ e $[\text{C}_4\text{mim}]^+$.

Tal como é possível verificar através da análise da Figura 23, em todos os casos estudados, exceto para a condição de 1% de [C4mim][HSO₄], a adição de apenas 1% de LI ao sistema polímero-polímero original favorece a extração de IgG para a fase rica em PEG. A diminuição do rendimento associada ao sistema com 1% de [C4mim][HSO₄] deve-se, possivelmente, à perda do anticorpo devido à sua precipitação que é visível macroscopicamente na Figura 20. De acordo com os resultados obtidos, o rendimento de extração da IgG para a fase superior dos sistemas segue as seguintes tendências em termos dos aniões que compõem o LI: [Ac]⁻ > Cl⁻ e Cl⁻ > Br⁻ >> [HSO₄]⁻, para os catiões [Ch]⁺ e [C4mim]⁺, respetivamente. Em todas as situações, com a exceção [C4mim][HSO₄], há então um aumento do rendimento de extração para valores superiores a 70% (correspondente ao valor aproximado do SAB controlo, no qual não há adição de qualquer LI). Mais ainda, esta tendência encontra-se concordante com o valor de β dos LIs em questão. Como foi referido anteriormente, o parâmetro β dos LIs é um parâmetro solvatocrómico que define a capacidade de um dado LI aceitar prótons, ou doar um par eletrónico numa ligação de hidrogénio soluto-solvente [195, 196]. De facto, os LIs com os aniões Cl⁻ e Br⁻ são os que apresentam uma basicidade de ligação de hidrogénio mais elevada (Cl⁻ (0,95) > Br⁻ (0,87) [195]), o que reflete a sua elevada polaridade ou afinidade para a água. Uma vez que com os dois LIs contendo estes aniões verifica-se um aumento do rendimento de extração da IgG, significa que, pelo menos com 1% de LI, estabelecem-se ligações de hidrogénio específicas que possivelmente apresentam uma influência positiva no mecanismo de extração da IgG nestas situações. Este comportamento permite corroborar os resultados de investigações realizadas anteriormente [23] com a utilização do anião Cl⁻ na forma de sal inorgânico NaCl, em que com a utilização de 150 mM deste sal, os autores conseguiram aumentar para 84% a extração de IgG, uma vez que a presença de sal cria um potencial elétrico entre as duas fases que pode conduzir as proteínas para uma ou outra fase, de acordo com a sua carga [135]. No entanto, com os resultados obtidos neste trabalho verifica-se ser possível atingir resultados comparáveis aos reportados pelos autores, com a utilização de uma quantidade de LI comparável com a quantidade requerida de NaCl. É ainda importante salientar que, no caso particular dos LIs derivados do catião [C4mim]⁺, é possível que sejam estabelecidas ainda interações $\pi \cdots \pi$ entre os aminoácidos aromáticos da IgG e o anel aromático que constitui o catião imidazólio, e que apresentem assim algum efeito ao nível da partição da IgG. Em resumo, é possível denotar que LIs constituídos por aniões com maior capacidade de estabelecer pontes de hidrogénio potenciam a extração de IgG para a fase superior rica em PEG, provavelmente

devido à sua capacidade de manipular e alterar naturalmente as propriedades químicas e físicas da fase rica em polímero e de estabelecer determinadas interações com a proteína.

3.4.2.3. Efeito da concentração do LI

Finalmente, procedeu-se à avaliação do efeito da concentração do LI, através da adição de diferentes LIs ao sistema original polímero-polímero em três diferentes concentrações. Para tal, o estudo foi conduzido utilizando diversos LIs, nomeadamente o $[N_{1111}]Cl$, $[N_{4444}]Cl$, $[P_{4444}]Cl$, $[C_4-4mpy]Cl$, $[Ch]Cl$, $[Ch][Ac]$, $[C_4mim]Cl$, $[C_4mim]Br$ e o $[C_4mim][HSO_4]$. Todos os LIs foram adicionados a 1, 5 e 10% (m/m) ao sistema PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H_2O , permitindo assim inferir acerca do efeito do aumento da concentração de cada LI no comportamento de partição da IgG.

Numa estratégia inicial, cinco dos nove LIs em estudo foram testados – $[N_{4444}]Cl$, $[P_{4444}]Cl$, $[C_4-4mpy]Cl$, $[Ch][Ac]$ e $[C_4mim][HSO_4]$ – sendo que os dados obtidos para os rendimentos de extração e respetivos desvios-padrão encontram-se representados na Figura 25, e os coeficientes de partição com os respetivos desvios-padrão encontram-se representados na Figura 26. Investigou-se ainda os valores de pH de cada fase do sistema, uma vez que se trata de um parâmetro extremamente relevante na partição das biomoléculas em SAB, encontrando-se esses resultados igualmente representados em cada um dos gráficos.

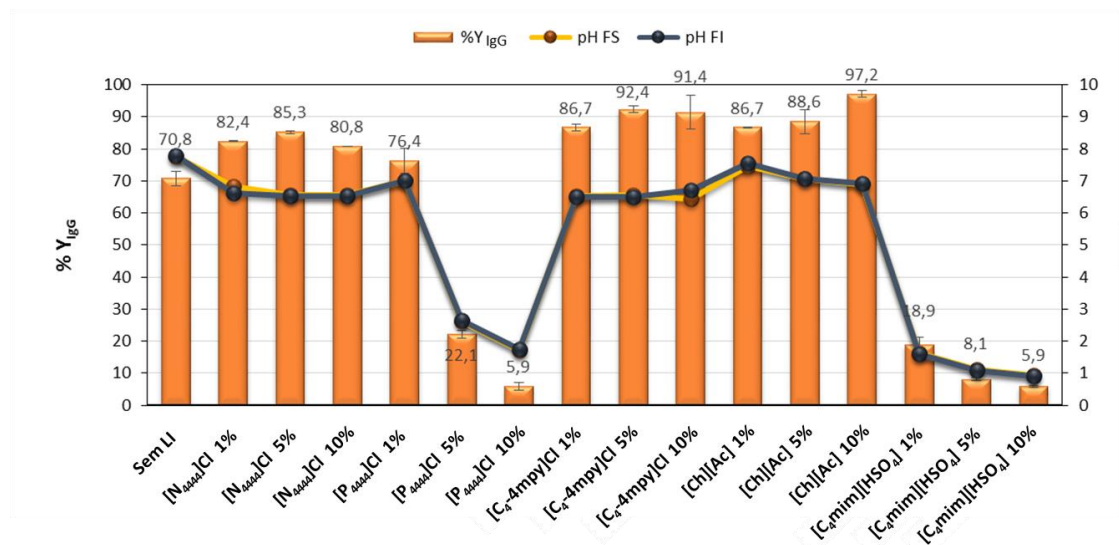


Figura 25 – Rendimentos de extração da IgG (% Y_{IgG}) nos SAB quaternários formados por PEG + dextrano + H_2O + 1, 5 e 10% dos LIs $[N_{4444}]Cl$, $[P_{4444}]Cl$, $[C_4-4mpy]Cl$, $[Ch][Ac]$ e $[C_4mim][HSO_4]$. Os valores de pH na fase superior (FS) e na fase inferior (FI) dos sistemas encontram-se igualmente representados no gráfico.

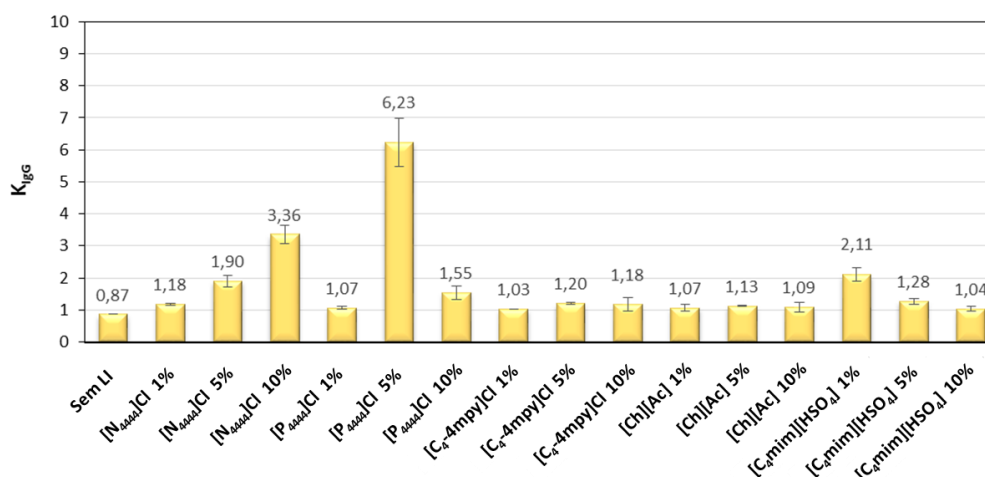


Figura 26 – Coeficientes de partição da IgG (K_{IgG}) nos SAB quaternários formados por PEG + dextrano + H₂O + 1, 5 e 10% dos LIs [N₄₄₄₄]Cl, [P₄₄₄₄]Cl, [C₄-4mpy]Cl, [Ch][Ac] e [C₄mim][HSO₄].

De acordo com os resultados obtidos, e tal como é possível observar na Figura 25, em todas as condições estudadas para o [N₄₄₄₄]Cl, [C₄-4mpy]Cl e [Ch][Ac], a adição de pequenas quantidades de LI (no máximo até 10%) ao sistema polímero-polímero original favorece a extração de IgG para a fase rica em PEG. Mais ainda, esta evidência é suportada por um aumento dos coeficientes de partição da IgG para valores superiores a 1 em todas as condições envolvendo a utilização de LIs, tal como se pode verificar na Figura 26. Assim, com a utilização das diferentes concentrações de LI constata-se mesmo uma alteração do comportamento de partição da proteína, que passa a apresentar uma maior afinidade para a fase superior rica em PEG.

De um modo geral, o aumento da concentração de LI adicionado ao sistema encontra-se associado a ligeiros aumentos do rendimento de extração de IgG para a fase rica em PEG, embora se tratem de aumentos pouco acentuados e não-proporcionais à quantidade de LI adicionado. De facto, com as diferentes concentrações de [N₄₄₄₄]Cl verifica-se um aumento do rendimento de 70,8% para valores percentuais compreendidos entre 80,8% e 85,3%. Com o [C₄-4mpy]Cl obtiveram-se ainda melhores resultados, com rendimentos a variar entre os 86,7% e os 92,4% e com o [Ch][Ac] obtiveram-se rendimentos comparáveis compreendidos entre 86,7% e 97,2%. No entanto, as diferenças observadas em termos de rendimentos de extração entre os sistemas com 5% e com 10% de LI não aparentam ser consideráveis, dado que os rendimentos obtidos para ambas as situações aparentam ser comparáveis pelo menos para o [N₄₄₄₄]Cl e para o [C₄-4mpy]Cl. É importante salientar o sistema constituído por PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H₂O + 10% [Ch][Ac] que permitiu atingir um rendimento de extração de IgG para a fase rica em

PEG superior a 97% em apenas uma etapa de extração, sendo este o rendimento máximo alcançado nas condições estudadas nesta etapa.

No caso dos sistemas constituídos por $[P_{4444}]Cl$ e $[C_4mim][HSO_4]$ verificou-se uma tendência contrária à dos restantes LIs, isto é, com o aumento da concentração de ambos os LIs constata-se um decréscimo contínuo em termos de rendimento de extração de IgG para a fase superior. Para justificar o comportamento exibido por estes LIs torna-se fulcral analisar atentamente os valores de pH de cada uma das fases dos sistemas igualmente representados na Figura 25. De facto, no caso do $[P_{4444}]Cl$ o comportamento exibido é curioso e não expectável. Com a adição de apenas 1% deste LI verifica-se um aumento do rendimento de 70,8% para 76,4% com um valor de pH em ambas as fases de aproximadamente 7,0. Contudo, quando incrementamos a concentração de LI para 5%, o pH decresce para cerca de 2,6, acompanhado por um decréscimo no rendimento para 22,1%, decrescendo mesmo para 5,9% com 10% de LI. O decréscimo do valor de pH com o aumento da concentração de $[P_{4444}]Cl$ não era previsível, uma vez que trata-se de um LI que não faz especiação e que portanto não deveria ter este efeito dramático no valor de pH. Para além disso, foram testadas as mesmas condições deste LI tamponizando os sistemas com solução salina de tampão fosfato (PBS, pH 7,4) obtendo-se resultados idênticos aos aqui apresentados/discutidos. Uma vez que este LI foi produzido e adquirido à escala industrial, apresenta um nível de pureza baixo que pode justificar este comportamento pouco expectável, uma vez que pode conter ainda resíduos de ácidos muito fortes necessários para a síntese do LI e que possam causar o abaixamento dramático do valor de pH das fases coexistentes dos sistemas. Já no caso do $[C_4mim][HSO_4]$, verifica-se que basta a adição de uma pequeníssima quantidade de LI (apenas 1%) para causar um abaixamento abrupto do pH no sistema para cerca de 1,6 e que resulta num decréscimo do rendimento de 70,8% para 18,9%, sendo que com o aumento da concentração atingem-se valores de pH a rondar os 0,93 e que levam à obtenção de baixos rendimentos de extração de IgG (inferiores a 6%). Contudo, uma vez que este LI sofre especiação e é um LI bastante ácido devido à presença do anião $[HSO_4]^-$, torna-se compreensível o seu efeito no processo de extração de IgG. Para além de tudo isto, foi possível observar macroscopicamente (Figura 20) a formação de camadas de proteína precipitada nos sistemas constituídos por estes LIs. Deste modo, é possível concluir que condições mais acídicas (causadas pela presença de componentes acídicos nos sistemas, neste caso LIs) promovem a desnaturação e consequente precipitação da IgG, levando a perdas no rendimento de extração por perda da proteína. Mais ainda, é

possível concluir que os melhores resultados de extração de IgG para a fase rica em PEG foram obtidos num intervalo de valores de pH compreendidos entre 6,5 e 7,5, pelo que se conclui que os valores de pH incluídos neste intervalo são os mais apropriados para a extração de IgG. As observações supracitadas, contestam, contudo, as evidências descritas anteriormente na literatura. Aires-Barros e os seus colaboradores [23] avaliaram a extração e precipitação de IgG humana igualmente em SAB constituídos por PEG 3350 e dextrano 500 kDa a diferentes valores de pH (entre 3 e 8). Os autores observaram precipitação severa (cerca de 50%) na gama de valores de pH compreendidos entre 5 e 8, sendo que a valores de pH mais acídicos a precipitação era consideravelmente reduzida. Apesar disso, no estudo desenvolvido nesta tese, verificou-se, por um lado, a ocorrência de precipitação severa a valores de pH mais acídicos, enquanto que, por outro lado, a extração de IgG foi potenciada e a sua precipitação reduzida a valores de pH mais próximos do pH fisiológico, numa gama compreendida entre 6,5 – 7,5.

Torna-se ainda importante salientar a discrepância relativa aos rendimentos de extração de IgG nos sistemas constituídos por $[P_{4444}]Cl$ e por $[N_{4444}]Cl$, uma vez que se tratam de LIs extremamente semelhante, diferindo apenas no átomo central do catião, e que apresentam apetências muito distintas para a extração de IgG. Efetivamente, as extrações com o $[N_{4444}]Cl$ apresentam rendimentos muito superiores aos obtidos com a utilização do fosfónio correspondente. Deste modo, o átomo central do catião aparenta ter um papel fulcral no controlo do processo de extração, e que pode estar associado à eletronegatividade de cada um destes átomos. Uma vez que o azoto (eletronegatividade = 3,04) é mais eletronegativo que o fósforo (eletronegatividade = 2,19), significa que tem maior tendência para atrair eletrões. Deste modo, ocorre o aparecimento e concentração de uma carga negativa no átomo central do catião do LI derivado do amónio, e tornando-o mais polar comparativamente com o fosfónio. Assim, o $[N_{4444}]Cl$ promove possivelmente o estabelecimento de ligações eletrostáticas entre si e o anticorpo, que se encontra carregado positivamente uma vez que o pH de todos os sistemas formados com este LI é inferior à gama de pI da IgG pura. Desta forma torna-se possível justificar a maior apetência do $[N_{4444}]Cl$ para a extração de IgG relativamente ao $[P_{4444}]Cl$ com base nas diferenças de eletronegatividade do átomo central do catião que constitui cada um destes LIs.

Seguidamente, foram testados mais quatro diferentes LIs – $[Ch]Cl$, $[N_{1111}]Cl$, $[C_4mim]Cl$ e $[C_4mim]Br$ – sendo que os dados obtidos para os rendimentos de extração e respetivos desvios-padrão encontram-se representados na Figura 27, e os coeficientes de

partição com os respectivos desvios-padrão encontram-se representados na Figura 28. Para além disso, uma vez que os LIs são adicionados ao sistema como adjuvantes, estes próprios apresentam uma partição diferencial pelas duas fases aquosas coexistentes; assim, investigou-se ainda a eficiência de extração de cada um dos LIs em estudo para a fase superior do sistema correspondente, encontrando-se esses resultados igualmente representados na Figura 27.

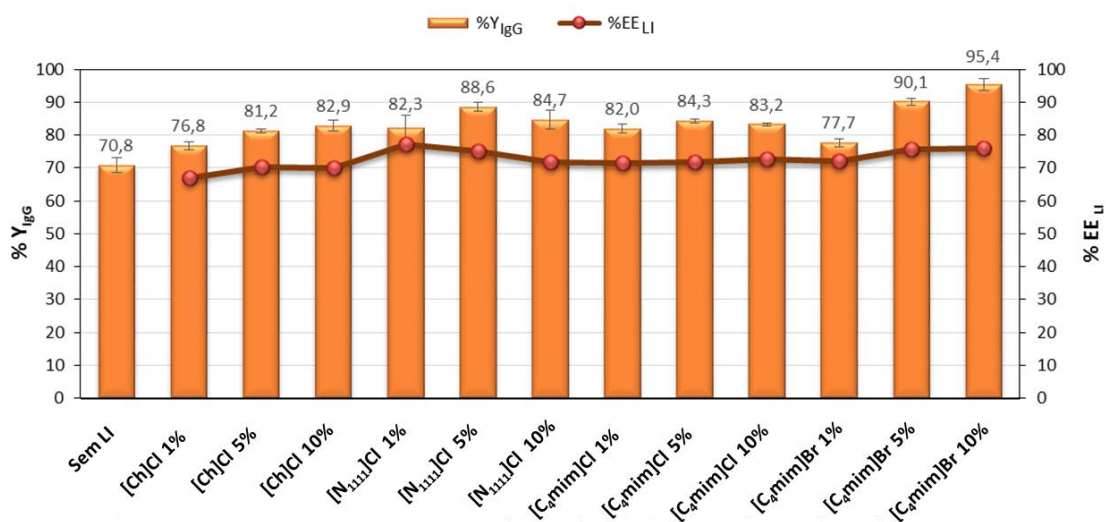


Figura 27 – Rendimentos de extração da IgG (% Y_{IgG}) nos SAB quaternários formados por PEG + dextrano + H₂O + 1, 5 e 10% dos LIs [Ch]Cl, [N₁₁₁₁]Cl, [C₄mim]Cl e [C₄mim]Br. A eficiência de extração de cada LI para a fase superior rica em PEG dos sistemas encontra-se igualmente representada no gráfico.

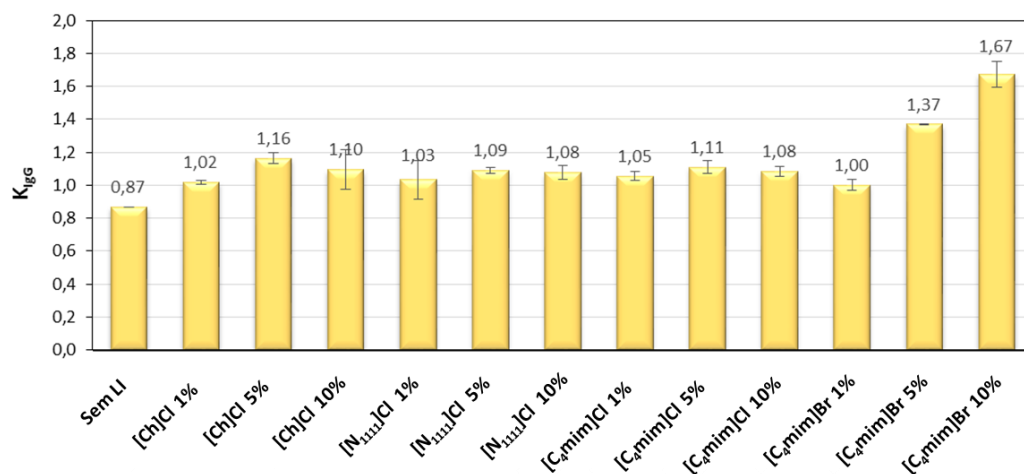


Figura 28 – Coeficientes de partição da IgG (% Y_{IgG}) nos SAB quaternários formados por PEG + dextrano + H₂O + 1, 5 e 10% dos LIs [Ch]Cl, [N₁₁₁₁]Cl, [C₄mim]Cl e [C₄mim]Br.

De acordo com os resultados obtidos, e tal como é possível observar na Figura 27, em todas as condições estudadas dos LIs [Ch]Cl, [N₁₁₁₁]Cl, [C₄mim]Cl e [C₄mim]Br, a adição de quantidades diminutas destes LIs como adjuvantes ao sistema polímero-

polímero permite aumentar a extração de IgG para a fase rica em PEG de 70,8% para valores superiores a 76,8%. Os resultados revelaram-se deste modo extremamente promissores, tendo sido atingidos rendimentos de extração superiores a 76% e até cerca de 95%. Mais ainda, o mesmo comportamento é verificado através da análise da Figura 28, uma vez que o coeficiente de partição da IgG aumenta de 0,87 (indicando uma maior afinidade para a fase inferior do sistema) para valores iguais ou superiores a 1 com a utilização de LIs (indicando uma maior propensão de migração da proteína para a fase superior do sistema).

De um modo geral, o aumento da concentração de LI adicionado ao sistema não aparenta ter uma correlação direta com a quantidade de IgG extraída para a fase rica em PEG, dado que os rendimentos de extração observados para um determinado LI não oscilam consideravelmente com o aumento da concentração de LI adicionado ao sistema. Excecionalmente, apenas nos resultados obtidos para o [C₄mim]Br se constata maiores aumentos no rendimento de extração em função da concentração do LI. A mesma tendência é possível observar relativamente aos coeficientes de partição da proteína, uma vez que para os LIs [Ch]Cl, [N₁₁₁₁]Cl e [C₄mim]Cl os valores dos coeficientes são apenas ligeiramente superiores a 1, embora aproximadamente constante e sem denotarem qualquer tendência de aumento com o aumento da concentração de cada um dos LIs. Apenas no caso do [C₄mim]Br essas diferenças são mais notórias, sendo possível atingir um coeficiente de partição superior a 1,6 com a utilização de 10% deste LI. Deste modo, e de acordo com estas observações, é possível concluir que é a estrutura química do LI que apresenta um papel determinante no comportamento de partição da IgG nos sistemas, e que o efeito da sua estrutura química é muito mais relevante do que o efeito da sua concentração.

Uma vez que os LIs são adicionado ao SAB polímero-polímero, eles próprios particionam-se pelas duas fases aquosas coexistentes. De acordo com os resultados obtidos, todos os LIs investigados particionam preferencialmente para a fase superior rica em PEG, tendo sido obtidas eficiências de extração compreendidas entre aproximadamente 66% e até mais de 77%. Contudo, a quantidade de LI presente na fase rica em PEG não se trata de um fator condicionante na partição de IgG, pelo que a extensão de migração dos LIs para a fase rica em polímero não apresenta um efeito substancial no grau de partição da IgG. Não obstante, a partir dos resultados obtidos e considerando que todos os LIs apresentam eficiências de extração superiores a 66% para a fase superior do sistema quando adicionados a qualquer das concentrações estudadas, é

possível sugerir que nas condições com as concentrações mais elevadas de LI, adicionado para aumentar a migração de IgG para a fase superior, este possivelmente encontra-se em excesso, e uma vez mais é possível corroborar a noção de que a natureza química do LI apresenta o papel mais relevante neste estudo. Deste modo, e tendo em vista apenas a extração seletiva de IgG para a fase superior rica em PEG, podemos concluir que a concentração mais baixa de LI testada aparenta ser suficiente para potenciar e otimizar a partição/extração de IgG, acarretando consigo vantagens adicionais relacionadas com o custo do SAB e com questões de biocompatibilidade. Por tudo isto, é possível sugerir que os LIs investigados estabelecem interações não-covalentes com a proteína de interesse, aumentando a sua partição para a fase rica em polímero (a fase que se apresenta igualmente rica em LI), e ainda que os LIs atuam como agentes de “salting-in”.

Apesar destas evidências, é importante destacar que o sistema constituído por [C₄mim]Br denotou um aumento crescente no nível de rendimento de extração de IgG com o aumento da sua concentração no sistema, acompanhado por um aumento considerável do seu coeficiente de partição, tendo sido atingido um excelente rendimento a rondar os 95% com a percentagem máxima deste LI. Uma vez que este apresentou um comportamento notoriamente crescente em termos de rendimento/coeficiente com o aumento da concentração, tornou-se relevante inferir acerca da potencialidade deste LI em outras concentrações tendo em vista a extração completa da IgG para a fase rica em polímero numa única etapa. Para o efeito, procedeu-se à realização de novos ensaios utilizando concentrações ainda mais elevadas deste LI, nomeadamente 15, 20 e 35%.

Tabela 9 – Pontos de mistura estudados com vista à extração de IgG com o sistema ternário controlo PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H₂O e com os sistemas quaternários PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H₂O + LI.

[PEG] % (m/m)	[dextrano] % (m/m)	[Solução IgG] % (m/m)	[[C ₄ mim]Br] % (m/m)	[H ₂ O] % (m/m)
Sistema ternário PEG 3350 + dextrano 500 kDa + solução <i>stock</i> IgG				
7	5	30	-	58
Sistema quaternário PEG 3350 + dextrano 500 kDa + [C₄mim]Br + solução <i>stock</i> IgG				
7	5	30	1	57
			5	53
			10	48
			15	43
			20	38
			35	23

Os pontos de mistura selecionados para a extração de IgG pura Gammanorm encontram-se apresentados na Tabela 9. Na Figura 29, pode observar-se o aspeto macroscópico dos sistemas de extração com a composição descrita na Tabela 9. Tal como se pode verificar através da análise da imagem, não se constatou a formação de qualquer fase sólida de proteína precipitada e/ou desnaturada que impedisse o particionamento de IgG pelas duas fases aquosas. Assim, apesar de ser notória a alteração da razão volumétrica com aumento da concentração de LI, é possível concluir que a presença do LI mesmo em elevadas concentrações, não causa a precipitação da proteína (pelo que se infere macroscopicamente). Deste modo, todos os SAB representados na Figura 29, foram utilizados nas análises subsequentes uma vez que se revelaram adequados à partição de IgG pelas duas fases aquosas coexistentes.

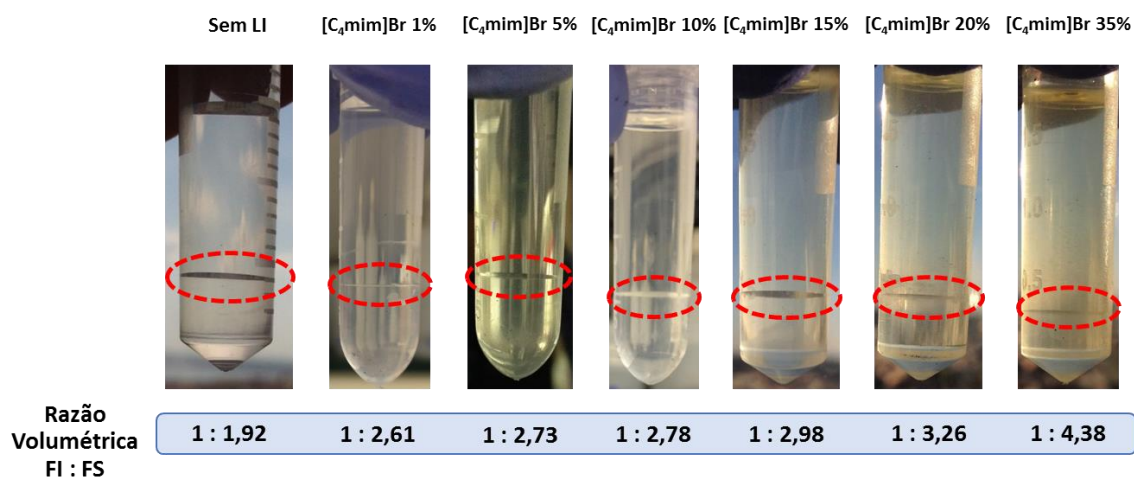


Figura 29 – Aspeto macroscópico dos sistemas PEG + dextrano + H₂O, com diferentes concentrações de [C₄mim]Br como adjuvante, que permitiram a formação de SAB apropriados à partição da IgG. A razão volumétrica das fases coexistentes (fase inferior – FI; fase superior – FS) encontra-se indicada na barra azul, e a interface do sistema encontra-se realçada com um círculo descontinuo vermelho.

Após a separação de ambas as fases aquosas coexistentes dos sistemas de extração, foi estudado o comportamento de partição da IgG no sistema controlo sem LI e nos sistemas com diferentes concentrações de LI compreendidas entre 1 e 35%. Os dados obtidos para os rendimentos de extração de IgG e eficiências de extração de [C₄mim]Br para a fase superior dos sistemas e respetivos desvios-padrão encontram-se representados na Figura 30.

Efetivamente, os resultados referentes às extrações com diferentes concentrações de [C₄mim]Br apresentam-se extremamente promissores, tendo em vista a extração de IgG. De acordo com os resultados obtidos, é possível referenciar duas condições que

permitiram a extração completa de IgG para a fase superior rica em PEG em apenas uma etapa de extração.

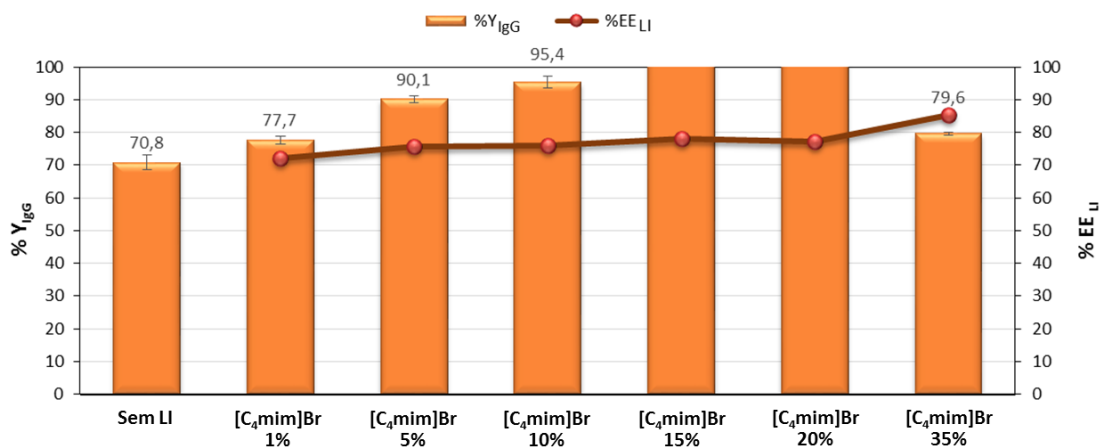


Figura 30 – Rendimentos de extração da IgG (% Y_{IgG}) nos SAB quaternários formados por PEG + dextrano + H₂O + 1, 5, 10, 15, 20 e 35% de [C₄mim]Br. A eficiência de extração do LI para a fase superior rica em PEG dos sistemas encontra-se igualmente representada no gráfico.

De facto, nos sistemas constituídos por 15% [C₄mim]Br e 20% [C₄mim]Br verificou-se um aumento do rendimento de extração de IgG de cerca de 70% para 100%, atingindo-se assim a extração completa da biomolécula de interesse para a fase superior em ambas as condições. Deste modo, há um aumento no nível do rendimento com o aumento da concentração de LI até 15%, sendo esta a condição na qual se atinge o máximo possível de extração de proteína. Mais ainda, apenas no sistema constituído pela concentração máxima de LI estudada (35% de [C₄mim]Br) se verifica um decréscimo do rendimento de extração para cerca de 80%. A origem deste decréscimo prende-se, possivelmente, com a ocorrência de desnaturação da proteína que não é observável macroscopicamente, uma vez que a presença de uma concentração tão elevada de LI pode acarretar consigo alguns problemas de biocompatibilidade para a biomolécula.

Uma vez mais é possível constatar a mesma relação entre a quantidade de LI presente na fase rica em PEG e a partição de IgG anteriormente discutida. Inclusive, no sistema em que se conseguiu a maior extração de LI para a fase superior (% EE_{LI} > 85%) verificou-se um decréscimo do rendimento comparativamente com a condição anterior estudada. Assim sendo, a extensão de migração dos LIs para a fase rica em polímero não é um fator condicionante na partição da IgG, pelo que esta se apresenta mais uma evidência que permite corroborar a ideia de que a estrutura do LI apresenta um papel fulcral na partição da proteína. Deste modo, é possível concluir que este LI estabelece interações não-covalentes com a IgG, aumentando a sua partição para a fase rica em PEG. Em particular,

uma vez que este LI é constituído por um anel aromático, é possível que se estabeleçam interações do tipo $\pi\cdots\pi$ entre os aminoácidos aromáticos da IgG e o anel aromático do LI ou interações do tipo catião $\cdots\pi$ entre a IgG (que ao pH a que o trabalho foi desenvolvido se encontra carregada positivamente) e o anel aromático que constitui o catião do LI, e que possivelmente governem o comportamento de partição da IgG nos SAB estudados.

Após este processo de otimização da extração de IgG utilizando SAB polímero-polímero constituídos por LIs como adjuvantes, foi possível perceber e justificar adequadamente os mecanismos moleculares que governam a partição de IgG neste tipo de sistemas quaternários, sendo possível destacar três condições que permitiram a obtenção de resultados extremamente promissores do ponto de vista da extração de IgG. Neste sentido, é importante realçar o sistema constituído por PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H₂O + 10% [Ch][Ac] que permitiu alcançar um rendimento de extração superior a 97%, e os sistemas PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H₂O + 15% [C₄mim]Br e PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H₂O + 20% [C₄mim]Br que permitiram obter 100% de extração da proteína para a fase superior rica em PEG, sendo portanto, as condições mais adequadas e que mais potenciam a extração de IgG.

3.5. Extração de IgG anti-IL-8 a partir de sobrenadantes de culturas celulares CHO

Após a etapa de otimização da extração de IgG utilizando IgG humana comercial/pura, e após a determinação dos sistemas mais promissores no que concerne à sua extração seletiva para a fase rica em PEG, procedeu-se à avaliação da sua potencialidade como plataformas de purificação de anticorpos monoclonais IgG anti-IL-8 diretamente a partir de sobrenadantes de culturas celulares CHO DP-12 produzidos previamente no capítulo 3.1. desta dissertação.

Assim, a estratégia nesta etapa do trabalho passou por testar as condições mais promissoras estudadas anteriormente na extração e purificação de IgG a partir de uma matriz real, sendo então estudadas as seguintes condições: 1, 5 e 10% de [Ch][Ac] e 10, 15 e 20% de [C₄mim]Br. Os pontos de mistura das condições selecionadas para a extração de IgG diretamente a partir dos sobrenadantes das culturas celulares encontram-se sumariados na Tabela 10.

Tabela 10 – Condições testadas para a extração seletiva e purificação de IgG anti-IL-8 diretamente a partir de sobrenadantes de culturas celulares CHO DP-12 com o sistema ternário controlo PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H₂O e com os sistemas quaternários PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H₂O + LI.

LI	[PEG] % (m/m)	[dextrano] % (m/m)	[Sobrenadante] % (m/m)	[LI] % (m/m)	[H ₂ O] % (m/m)
Sistema ternário PEG 3350 + dextrano 500 kDa + sobrenadante contendo IgG anti-IL-8					
×	7	5	50	-	38
Sistema quaternário PEG 3350 + dextrano 500 kDa + LI + sobrenadante contendo IgG anti-IL-8					
[Ch]Ac	7	5	55	1	32
				5	28
				10	23
[C ₄ mim]Br	7	5	45	10	33
				15	28
				20	23

Na Figura 31, pode observar-se o aspeto macroscópico dos sistemas de extração com a composição descrita na Tabela 10. Tal como se pode verificar através da análise da imagem, não se constatou a formação de qualquer fase sólida de proteínas precipitadas e/ou desnaturadas que impedissem a partição da IgG pelas duas fases aquosas. Assim, todos estes SAB apresentaram-se adequados como sistemas de extração líquido-líquido de biomoléculas, mesmo quando carregados com elevadas concentrações de solução proteica. De facto, a concentração de solução contendo proteínas (IgG + impurezas proteicas provenientes do sobrenadante da cultura celular) foi muito superior neste sistemas de extração (45, 50 e 55%) do que a concentração estudada na partição da IgG pura (30%). O facto de não se ter observado precipitação de proteína nos sistemas em estudo mesmo com uma concentração de proteínas muito mais elevada, permite-nos concluir que não ocorreu a saturação de nenhuma das fases e que é então possível potenciar a extração de IgG com este tipo de sistemas processando grandes quantidades de amostras (representando mais de 50% do sistema de extração), sendo esta uma vantagem bastante representativa tendo em vista a aplicação destes sistemas a uma escala industrial.

Após a separação de ambas as fases aquosas coexistentes dos sistemas de extração, foi estudado o comportamento de partição das proteínas presentes nos sobrenadantes de culturas celulares CHO DP-12 (IgG + impurezas proteicas) no sistema controlo sem LI e nos sistemas contendo diferentes concentrações de dois LIs diferentes, que demonstraram

maior potencialidade no processo de otimização da extração de IgG apresentado anteriormente.

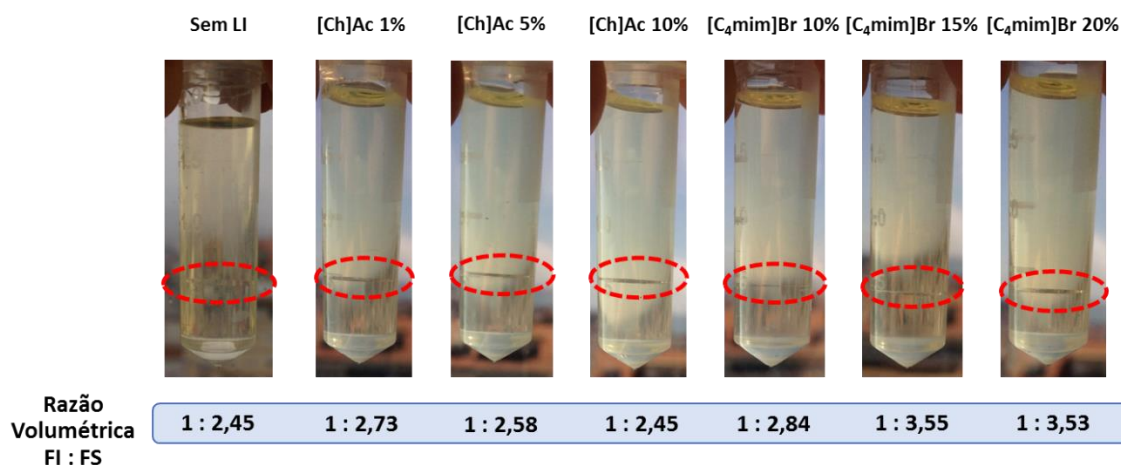


Figura 31 – Aspeto macroscópico dos sistemas PEG + dextrano + H₂O, com diferentes concentrações de [Ch][Ac] e [C₄mim]Br como adjuvantes, que permitiram a formação de SAB apropriados à partição da IgG e das impurezas proteicas presentes nos sobrenadantes das culturas celulares CHO DP-12. A razão volumétrica das fases coexistentes (fase inferior – FI; fase superior – FS) encontra-se indicada na barra azul, e a interface do sistema encontra-se realçada com um círculo descontinuo vermelho.

Os sistemas testados foram os constituídos por PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H₂O + 15% e 20% [C₄mim]Br uma vez que estes se revelaram como os sistemas mais promissores no capítulo anterior, permitindo a extração completa de IgG para a fase superior. Mais ainda, foi também testada a condição constituída por 10% [C₄mim]Br no sentido de explorar a utilização de menores concentrações de LI na extração de anticorpos a partir de uma matriz real e que possam levar a resultados tão interessantes como os obtidos com maiores concentrações deste aditivo. Também o sistema PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H₂O + 10% [Ch][Ac] permitiu um dos melhores resultado em termos de rendimento de extração de IgG apresentado no capítulo anterior, e como tal foram testadas todas as três concentrações referentes a este LI, por um lado pelo motivo de explorar concentração mais reduzidas de LI nesta situação e por outro lado devido ao facto de se tratar de um LI mais biocompatível e que na eventualidade de atingir rendimentos de extração/ níveis de pureza comparáveis aos do imidazólio anteriormente descrito, a sua utilização seria preferível.

Posto isto, pretendeu-se assim avaliar a eficiência destes sistemas no que concerne à extração seletiva da IgG para a fase superior rica em PEG de cada sistema, retendo em simultâneo as impurezas proteicas na fase oposta, e para tal foram determinados os rendimentos de extração de IgG para a fase superior do sistema e o nível de pureza com que o anticorpo foi extraído para essa mesma fase. Assim sendo, os dados obtidos para

os rendimentos de extração e grau de pureza da IgG na fase rica em PEG e respetivos desvios-padrão encontram-se representados na Figura 32, e os coeficientes de partição com os respetivos desvios-padrão encontram-se representados na Figura 33. Investigou-se ainda os valores de pH de cada fase do sistema, uma vez que se trata de um parâmetro extremamente relevante na partição das biomoléculas em SAB, encontrando-se esses resultados igualmente representados em cada um dos gráficos.

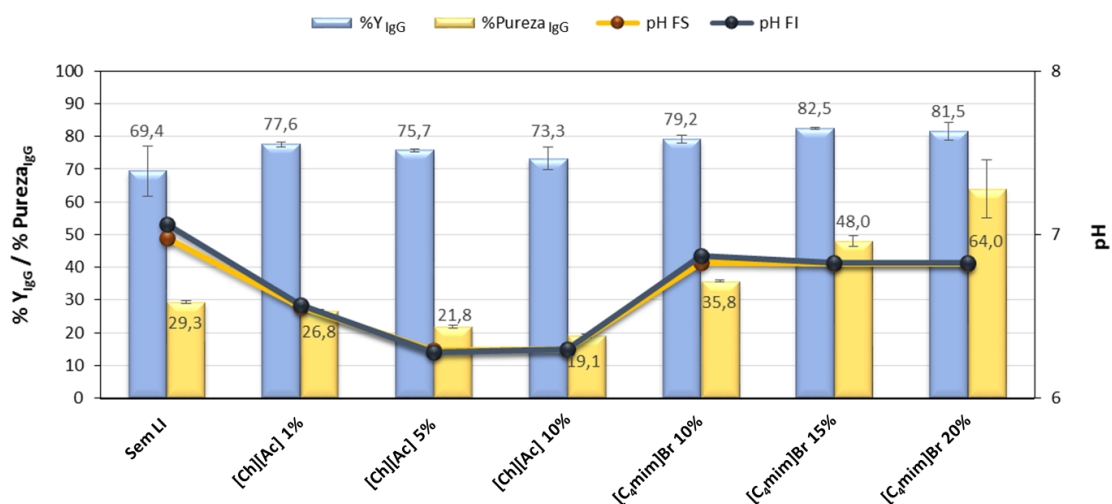


Figura 32 – Rendimentos de extração (%Y_{IgG}) e níveis de pureza (%Pureza_{IgG}) da IgG extraída a partir de sobrenadantes de culturas celulares CHO DP-12 através de SAB quaternários formados por PEG + dextrano + H₂O e com diferentes concentrações de LI como adjuvante (1, 5 e 10% de [Ch][Ac] + 10, 15 e 20% de [C₄mim]Br). Os valores de pH na fase superior (FS) e na fase inferior (FI) dos sistemas encontram-se igualmente representados no gráfico.

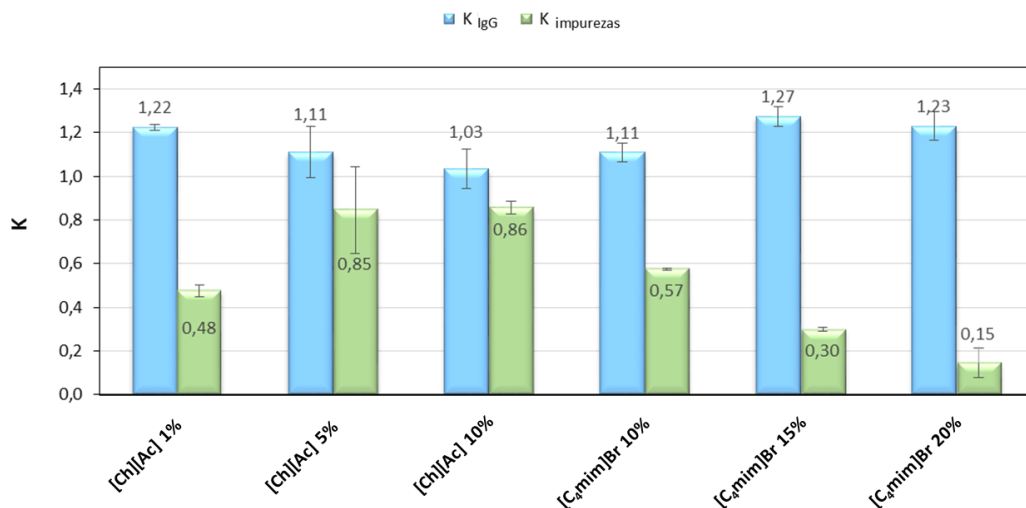


Figura 33 – Coeficientes de partição da IgG (%Y_{IgG}) extraída a partir de sobrenadantes de culturas celulares CHO DP-12 através de SAB quaternários formados por PEG + dextrano + H₂O e com diferentes concentrações de LI como adjuvante (1, 5 e 10% de [Ch][Ac] + 10, 15 e 20% de [C₄mim]Br).

Após uma análise cuidada dos resultados obtidos, é possível distinguir e interpretar de maneira diferente o efeito exercido por cada um dos LIs na extração seletiva e purificação

de IgG anti-IL-8 a partir dos sobrenadantes das culturas celulares. No entanto, de uma forma geral e tendo em consideração os resultados apresentados na Figura 32, é possível constatar que em todas as condições estudadas envolvendo a utilização de LIs há um aumento do rendimento de extração da IgG para a fase superior rica em PEG comparativamente com a condição original, em que nenhuma quantidade de LI é adicionado ao sistema. De facto, este aumento do rendimento de extração associado à utilização destes LIs já havia sido observado nas etapas de otimização do processo apresentadas anteriormente e portanto, a mesma tendência é observado quando utilizada uma matriz real de muito maior complexidade. Assim sendo, com a utilização de [Ch][Ac] foi possível aumentar o rendimento de extração de aproximadamente 69% para valores compreendidos entre cerca de 73% e 78%, e com a utilização de [C₄mim]Br o incremento no rendimento de extração foi ainda maior, para valores compreendidos entre aproximadamente 79% e 82%. No entanto, é importante realçar que os rendimentos de extração obtidos a partir da matriz real são inferiores aos que haviam sido obtidos com a utilização de IgG pura/comercial. Tal como foi discutido no capítulo 3.2. desta dissertação, os anticorpos monoclonais anti-IL-8 produzidos através das culturas celulares CHO DP-12 apresenta um único pI de aproximadamente 9,3, ao contrário da IgG comercial utilizada que apresenta uma gama de pIs compreendidos entre 7 e 9,3. Deste modo, a IgG proveniente das culturas celulares apresenta-se muito mais suscetível às condições do meio, fazendo com que pequeníssimas variações possam levar a alterações consideráveis do seu comportamento de partição nos SAB. Para além disso, é necessário lidar com uma muito maior complexidade da matriz real em que os anticorpos estão inseridos e que pode dificultar e alterar ligeiramente o equilíbrio termodinâmico e comportamento de partição das biomoléculas no sistema. Assim sendo, estes dois motivos apresentam-se como os mais plausíveis que justificam a diferença observada em termos de rendimento de extração para estas situações. Para além disso, estes resultados conjuntamente com os resultados dos coeficientes de partição destes sistemas apresentados na Figura 33, permitem uma vez mais denotar a ideia de que a estrutura química do LI apresenta de facto o papel principal no comportamento de partição da IgG para a fase superior, sendo que a concentração de LI não aparenta ter uma influência muito considerável na extração da IgG dada a obtenção de rendimentos de extração relativamente similares entre as diferentes concentrações de LI testadas.

Mais ainda, torna-se muito interessante compreender o efeito que os dois LIs apresentaram no que concerne ao grau de pureza da IgG, que nos permite efetuar uma

análise quantitativa da seletividade que as proteínas envolvidas apresentam. De acordo com os resultados obtidos para o [Ch][Ac], é possível verificar um decréscimo contínuo do nível de pureza da IgG com o aumento da concentração de LI. De facto, com apenas 1% de LI adicionado ao sistema, o nível de pureza decresce de 29,3% para 26,8%, sendo que se atinge o nível mínimo de pureza no sistema constituído por 10% deste LI, em que o nível de pureza atinge os 19,1%. Assim sendo, é possível concluir que a utilização de [Ch][Ac] apesar de aumentar a extração de IgG para a fase rica em PEG, também favorece a migração das restantes impurezas para essa mesma fase, promovendo a diminuição do grau de pureza da biomolécula de interesse. Deste modo, este LI aparenta exercer um maior efeito na migração das impurezas proteicas para a fase rica em PEG, do que propriamente na molécula-alvo. Para além disso, constata-se que o efeito da concentração do LI é notório no âmbito do grau de pureza da IgG, e a concentração de LI aparenta ter um papel fundamental na migração das impurezas proteicas, uma vez que estas migram mais para a fase superior do sistema com o aumento da concentração do LI. Por tudo isto, é possível concluir que a introdução de [Ch][Ac] no sistemas convencionais polímero-polímero embora se tenha revelado promissora tendo em vista a extração de IgG, revelou-se ineficiente para a sua purificação diretamente a partir dos sobrenadantes das culturas celulares, atingindo níveis de pureza inferiores aos obtidos com o sistema sem adição de qualquer LI.

No que diz respeito ao [C₄mim]Br, os resultados obtidos revelaram-se extremamente promissores. Surpreendentemente, verifica-se um aumento crescente no nível de pureza da IgG em função da concentração de LI adicionado ao sistema original polímero-polímero. De facto, nas condições testadas com este LI, constata-se um incremento do nível de pureza de cerca de 29% para valores compreendidos entre aproximadamente 37% e 64% com apenas uma etapa de extração. Deste modo, é possível concluir que este LI apresenta não só um efeito favorável na extração da IgG para a fase superior rica em PEG, como em simultâneo potencia a migração das impurezas proteicas para a fase inferior oposta, rica em dextrano. Tal situação reflete-se nos coeficientes de partição apresentados na Figura 33, na qual se verifica para todas as condições testadas com este LI um coeficiente de partição da IgG superior a 1, evidenciando a sua partição preferencial para a fase superior do sistema, enquanto que para as impurezas proteicas verifica-se um decréscimo contínuo do seu coeficiente, sendo este sempre muito inferior a 1, o que revela precisamente uma migração preferencial destas proteínas para a fase inferior dos sistemas. O resultado mais promissor obtido assim neste estudo, foi atingido com a

utilização deste último LI no sistema constituído por PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H₂O + 20% [C₄mim]Br, que permitiu a extração de aproximadamente 82% de IgG para a fase rica em PEG, retendo a maioria das impurezas proteicas na fase oposta, traduzindo-se num nível de pureza de 64,0% atingido numa única etapa de extração/purificação. Deste modo, através da adição de LI a um sistema polímero-polímero foi possível manipular a afinidade das fases coexistentes do sistema e obter assim uma seletividade oposta da IgG e das restantes impurezas proteicas para essas mesmas fases. Assim sendo, torna-se evidente a capacidade dos LIs alterarem e manipularem a polaridade entre as duas fases dos SAB, promovendo alterações na separação da IgG e das restantes impurezas proteicas pelas duas fases, que permitiram atingir uma separação seletiva destas biomoléculas, extraíndo e purificando seletivamente a IgG tal como pretendido.

3.6. Avaliação da integridade/estabilidade da IgG

Por fim, numa última abordagem e de forma a avaliar e caracterizar adequadamente todo o processo anteriormente descrito, pretendeu-se estudar a integridade e estabilidade da proteína de interesse, a IgG, após a etapa de SAB, e de forma a compreender se o processo de extração ou o contacto com os componentes que formam o SAB induz algum tipo de alterações na proteína.

Para tal, e ainda no seguimento do capítulo anterior, procedeu-se à execução de uma análise de SDS-PAGE de forma a avaliar qualitativamente a pureza das fases coexistentes dos sistemas contendo LIs e estudados na extração/purificação de IgG diretamente a partir de sobrenadantes de culturas celulares, através da obtenção do seu perfil proteico. Na Figura 34 apresentam-se os perfis proteicos da IgG pura/comercial, dos sobrenadantes das culturas celulares CHO DP-12 e das duas fases coexistentes dos vários SAB estudados no capítulo anterior desta dissertação.

Analizando inicialmente as bandas obtidas para os sistemas contendo [Ch][Ac], é efetivamente possível corroborar e confirmar os resultados descritos anteriormente relativos à purificação de IgG, uma vez que se constata a presença tanto de anticorpo como das restantes impurezas proteicas (e em particular a albumina) em ambas as fases coexistentes. Contudo, uma vez que a albumina consiste na impureza maioritária, será a proteína que terá uma maior influência para o grau de pureza. Efetivamente é possível verificar que a banda correspondente à albumina, a cerca de 67 kDa, apresenta cada vez menor intensidade na fase inferior dos sistemas com o aumento da concentração de LI,

comprovando a sua migração para a fase superior do sistema que causa então a diminuição no nível de pureza da IgG. Mais ainda, não se verifica diferenças de intensidade significativas nas bandas correspondentes ao anticorpo-alvo.

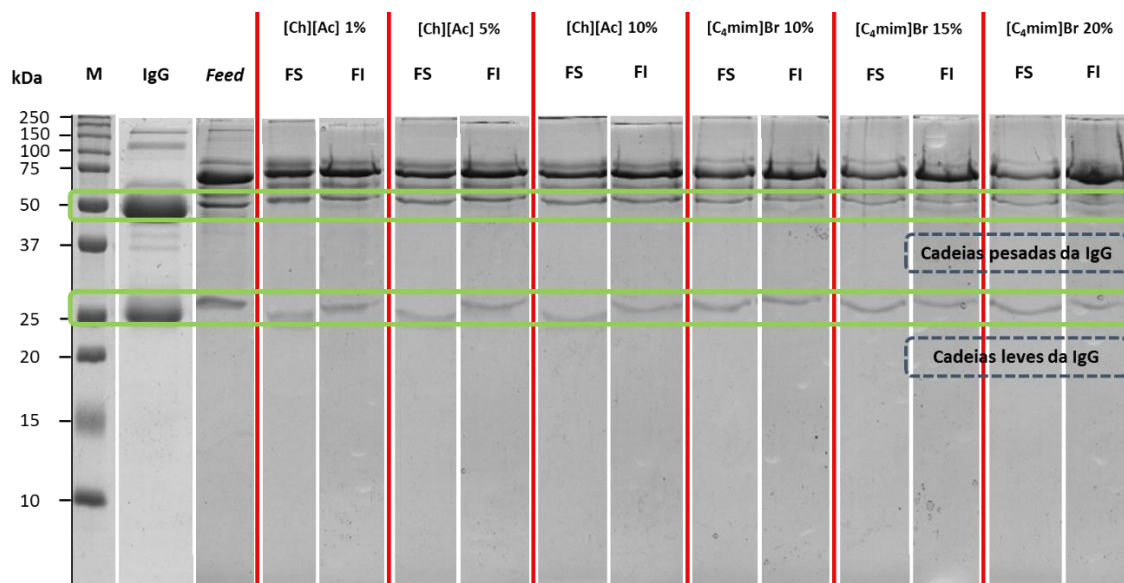


Figura 34 – SDS-PAGE de um gel 12% T e 3% C, corado com azul de Coomassie, carregado com as seguintes amostras: Poço 1 – marcador de peso molecular; Poço 2 – IgG pura Gammanorm; Poço 3 – sobrenadante proveniente de uma cultura celular CHO DP-12; Restantes poços – fase superior (FS) e fase inferior (FI) das extrações de IgG anti-IL-8 diretamente a partir de sobrenadantes de culturas celulares CHO DP-12, através de SAB constituídos por PEG + dextrano + H₂O e com diferentes concentrações de LI como adjuvante (1, 5 e 10% de [Ch][Ac] + 10, 15 e 20% de [C₄mim]Br). A posição das cadeias pesadas (50 kDa) e das cadeias leves (25 kDa) da IgG encontram-se destacadas e indicadas no próprio gel.

Relativamente aos sistemas contendo [C₄mim]Br, é possível constatar uma ligeira distorção das bandas e por vezes algum arrastamento de algumas bandas, que se relaciona essencialmente com dois motivos: primeiramente, pode estar relacionado com a presença dos polímeros constituintes das fases que devido à sua elevada viscosidade podem causar esse tipo de artefactos no gel; por outro lado, a utilização de LIs que são compostos iónicos interferem na passagem do campo elétrico em que se baseia a eletroforese, e daí verificar-se a perda de alguma resolução no gel. Apesar disso, em todas as concentrações testadas deste LI é evidente a existência de bandas referentes à IgG com maior intensidade na fase superior dos sistemas, indiciando precisamente uma extração seletiva do anticorpo para essa mesma fase rica em PEG. É também possível realçar o aumento da intensidade da banda referente à albumina na fase inferior dos sistemas com o aumento da concentração do LI, sendo que, com base no perfil proteico das fases coexistente, contata-se claramente no sistema constituído por 20% de [C₄mim]Br uma maior afinidade da IgG para a fase superior sendo a concentração da impureza maioritária muito menor nesta fase (com base na obtenção de uma banda muito menos intensa desta proteína na fase em

questão). Deste modo, através desta técnica foi possível comprovar a manipulação da polaridade das fases coexistentes do sistema polímero-polímero com a utilização de LIs, permitindo obter afinidades opostas para a IgG e para as impurezas proteicas, tratando-se portanto de conclusões bastante promissoras tendo em vista o desenvolvimento de uma plataforma eficiente de purificação de anticorpos monoclonais.

Para além desta análise qualitativa da seletividade dos sistemas testados, a análise por SDS-PAGE permitiu-nos ainda avaliar o efeito dos LIs no processo de extração e na possível degradação da IgG. Tal como se pode verificar na Figura 34, não se verifica a degradação da IgG em nenhuma das condições testadas, sendo possível constatar a sua integridade através da obtenção das duas bandas características deste anticorpo. Mais ainda, é possível confirmar a manutenção da sua massa molecular, uma vez que as bandas obtidas para as cadeias pesadas do anticorpo se situam a cerca de 50 kDa e as bandas referentes às cadeias leves do anticorpo estão presentes a aproximadamente 25 kDa, sendo que os ligeiros desvios verificados em algumas das condições relacionam-se com a viscosidade dos polímeros e dos próprios constituintes das fases. Deste modo, é possível concluir que os LIs estudados mantêm a integridade da proteína e como tal apresentam-se apropriados para o processo de extração e purificação da IgG a partir dos sobrenadantes das culturas celulares.

Seguidamente, o pI das proteínas presentes em cada uma das fases aquosas coexistentes após o processo de extração foi determinado, de modo a compreender se os processos de extração sugeridos/estudados induzem alguma modificação no anticorpo de interesse que possa levar à alteração do seu pI característico. Deste modo, na Figura 35 apresenta-se o gel de focagem isoeletrica com o perfil obtido para a IgG pura/comercial, para as proteínas presentes nos sobrenadantes das culturas celulares CHO DP-12 e nas duas fases coexistentes dos SAB constituídos por 10% [Ch][Ac] e por 15 e 20% de [C₄mim]Br.

De acordo com os resultados obtidos por IEF para as fases coexistentes dos sistemas utilizados para extrair IgG anti-IL-8 a partir dos sobrenadantes de culturas celulares, é possível verificar que a presença de [Ch][Ac] e [C₄mim]Br no processo de extração/purificação não afeta/altera o pI da proteína de interesse. De facto, ainda que muito ténues devido à diluição do anticorpo na fase para a qual é extraído, é possível constatar a banda referente à IgG anti-IL-8 a um pI de cerca de 9,3 em todas as situações estudadas. No sistema contendo 10% [Ch][Ac], constata-se a presença da banda referente ao anticorpo em ambas as fases coexistentes, sendo no entanto possível denotar a presença

de variadas proteínas acídicas na fase superior, referentes às impurezas proteicas, tal como já havia sido discutido anteriormente. Mais ainda, é notório que neste sistema existe uma maior prevalência das impurezas proteicas na fase superior do que na fase inferior do sistema, o que, uma vez mais, se encontra de acordo com a tendência de pureza atingida com este LI.

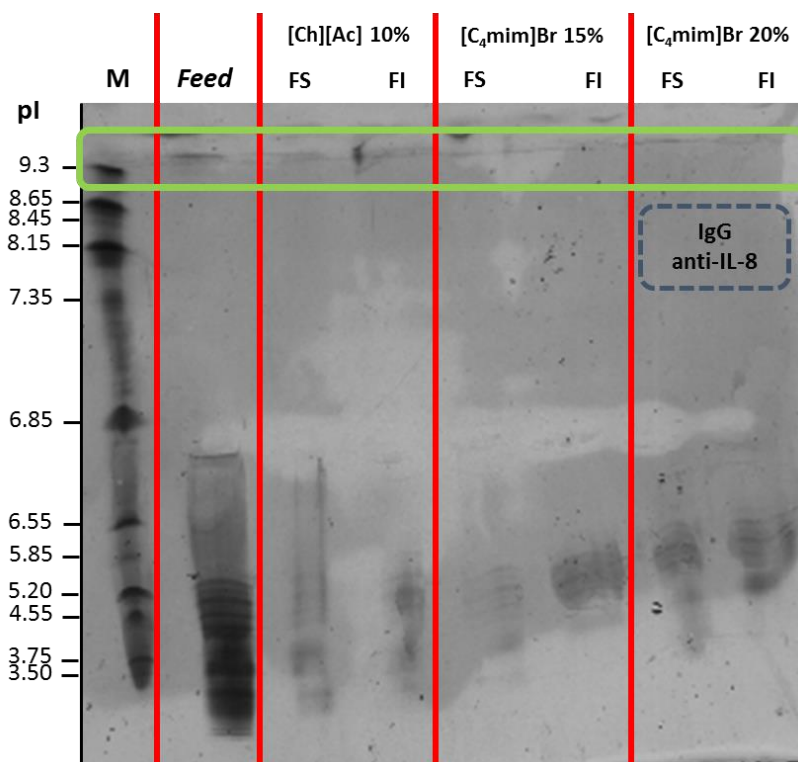


Figura 35 – Gel de focagem isoeletrica (IEF) 5% T e 3% C, corado com nitrato de prata e carregado com as seguintes amostras: Poço 1 – marcador de pontos isoeletricos; Poço 2 – IgG pura Gammanorm 1 g/L; Poço 3 – sobrenadante proveniente de uma cultura celular CHO DP-12; Restantes poços – fase superior (FS) e fase inferior (FI) das extrações de IgG anti-IL-8 diretamente a partir de sobrenadantes de culturas celulares CHO DP-12, através de SAB constituídos por PEG + dextrano + H₂O e com diferentes concentrações de LI como adjuvante (10% de [Ch][Ac] + 15 e 20% de [C₄mim]Br). A posição da banda referente ao pI da IgG encontra-se destacada a verde e indicada no próprio gel.

Já no caso dos sistemas contendo [C₄mim]Br, verifica-se a presença da banda referente à IgG na fase superior a um pI de aproximadamente 9,3, existindo no entanto um perfil associado às fases inferiores que contém um maior número de impurezas com pIs ácido, o que uma vez mais corrobora e sustenta os resultados para os níveis de pureza obtidos nestas situações. Por tudo isto, é possível inferir que o processo de extração e purificação da IgG a partir dos sobrenadantes das culturas celulares envolvendo a utilização de LIs aparenta ser adequado no que concerne à manutenção das propriedades físico-químicas da proteína de interesse, e em particular do seu pI.

Apesar de os SAB serem cada vez mais aplicados na extração e purificação de inúmeros biofármacos, torna-se impreterível inferir acerca da estabilidade do biofármaco

após ter sido sujeito ao processo de purificação. De facto, estudos conformacionais de macromoléculas biológicas foram já realizados através de dicroísmo circular (DC), mesmo não sendo atingida a determinação da sua estrutura detalhada [197]. O DC consiste num método rápido e pouco dispendioso e que não requer uma quantidade de amostra significativa, e que por ser conduzido em solução apresenta a vantagem de ser avaliada a estrutura da proteína tal como está presente na amostra, e sem que haja alteração da sua estrutura molecular como poderia ocorrer se esta fosse cristalizada para execução de outras técnicas que assim o exijam, como por exemplo a cristalografia de Raios-X [198]. Em particular, já foi provado que o dicroísmo circular (DC) é uma técnica bastante útil na determinação da estabilidade de proteínas, em particular de IgG, ao longo do processo de purificação utilizando SAB [158]. No trabalho desenvolvido por Borlido *et al.*, os autores conseguiram provar uma completa biocompatibilidade dos SAB constituídos por polímeros sensíveis à temperatura, sem qualquer influência dos componentes formadores das duas fases aquosas. Mais especificamente, em relação aos LIs, alguns “LIs hidratados” ou soluções aquosas de LIs já demonstraram ser meios extraordinários para a solubilização e estabilização de proteínas [199]. Outros estudos também demonstraram que soluções aquosas de LIs da família dos amónios são capazes de manter a estrutura nativa do citocromo c até concentrações de 50 – 70% de LI (contrariamente à desnaturação da proteína observada em soluções semelhantes de metanol ou acetonitrilo e água) [200]. Venkatesu e os seus colaboradores [201] demonstraram igualmente que os LIs da família dos amónios atuam como estabilizadores para proteínas globulares. Mais ainda, Taha *et al.* [202] demonstraram a estabilidade da BSA após uma etapa de extração utilizando SAB constituídos por um polímero e por LIs com capacidade tampão (*Good's buffers*), e Dreyer e Kragl [203] também mostraram que os LIs podem ser utilizados como componentes formadores de fases para extrair e estabilizar enzimas. Posto isto, parece plausível que os LIs possam ser integrados com sucesso nos processos de extração e purificação de biomoléculas, como é o caso da investigação aqui discutida.

Assim sendo, embora neste trabalho tenha sido demonstrado que a adição de pequenas quantidades de LIs como adjuvantes em SAB convencionais polímero-polímero aumentam o rendimento de extração e o nível de pureza da IgG, foram ainda desenvolvidos esforços no sentido de avaliar o efeito dos LIs e do próprio processo de extração que envolve a sua utilização, na estabilidade estrutural da IgG. Para tal, foram utilizadas duas técnicas espectroscópicas que nos permitiram investigar a integridade da

IgG em várias condições, nomeadamente a técnica de DC e a espectroscopia de fluorescência. O DC apresentou-se como uma técnica bastante promissora que nos permitiu assim inferir acerca da integridade da estrutura da proteína, e em particular da sua estrutura secundária, sem que fosse necessário recorrer a outros métodos, como por exemplo ELISA e proteína A para determinar a integridade das regiões Fab e Fc da IgG, respetivamente. Apesar disso, no estudo conduzido neste trabalho, uma vez que a quantificação da IgG nos SAB foi feita através de uma coluna de proteína G analítica, podemos comprovar *a priori* a manutenção da integridade da região Fc da IgG com a extração através de SAB constituídos por LIs como adjuvantes. Os estudos de fluorescência foram conduzidos no sentido de suportar os resultados de DC e inferir acerca da manutenção da estrutura terciária/enrolamento correto da IgG.

Neste sentido, a estratégia passou por estudar as condições que suscitaram mais interesse e/ou curiosidade na extração de IgG. De facto, uma das condições mais favoráveis e com as quais se estudou a sua potencialidade na extração e purificação de IgG anti-IL-8 diretamente a partir de sobrenadantes de culturas celulares foram as que incluíam o LI [Ch][Ac], pelo que foi então estudada a integridade da IgG após a extração com SAB contendo 1, 5 e 10% de [Ch][Ac]. Um outro LI que se revelou extremamente promissor para este propósito foi o [C₄mim]Br, que permitiu atingir excelentes resultados de extração e purificação da IgG. Contudo, a integridade da proteína na presença deste LI não foi estudada, uma vez que este LI contém um grupo imidazólio que apresenta um pico a 211 nm, isto é, absorve na região *Far-UV* (190 – 250 nm) que é a região que se pretendeu estudar, uma vez que é esta que nos permite inferir acerca dos elementos de estrutura secundária presentes nas proteínas. Isto significa que a obtenção de um espectro exato de DC de moléculas quirais nesta região seria inviável, mesmo depois da correção da linha de base. Assim sendo, a integridade da proteína na presença deste LI não pode ser determinada, e sugere-se que no futuro esta venha a ser estudada recorrendo a outras técnicas que se apresentem viáveis para o efeito, como por exemplo através de *Fourier Transform Infrared Radiation* (FTIR). No entanto, estudou-se também as condições contendo 1, 5 e 10% de [P₄₄₄₄]Cl, dado que levaram a um comportamento de extração que não seria expectável causando a perda de anticorpo com o aumento da concentração de LI introduzida no sistema, pelo que se tentou arrecadar nesta investigação algumas evidências acerca do efeito que este LI possa apresentar ao nível estrutural da IgG. É importante salientar que estes estudos foram conduzidos com IgG pura/comercial, e os resultados extrapolados para a IgG anti-IL-8 extraída a partir dos sobrenadantes das

culturas celulares, uma vez que não foi possível atingir a purificação completa da IgG numa única etapa e os estudos espectroscópicos desenvolvidos requerem a presença da proteína pura na amostra.

Assim sendo, os dados obtidos através do equipamento de DC foram tratados, sendo que se apresenta na Figura 36 os resultados em unidades de elepticidade molar da IgG em PBS (na sua forma nativa e com o seu enrolamento correto), na fase rica em PEG após uma etapa de extração utilizando um SAB constituído por PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H₂O e na fase rica em PEG após uma etapa de extração utilizando um SAB constituído por PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H₂O + diferentes concentrações de [Ch][Ac]. É importante salientar que a gama de comprimentos de onda escolhida foi de 198 – 250 nm (Região *Far-UV*) uma vez que a utilização de sais (e em particular LIs) aumentam excessivamente a absorção a valores de comprimento de onda menores [198], e esta foi a gama definida em ensaios preliminares que permitiu manter a absorvância total dentro dos limites aceitáveis.

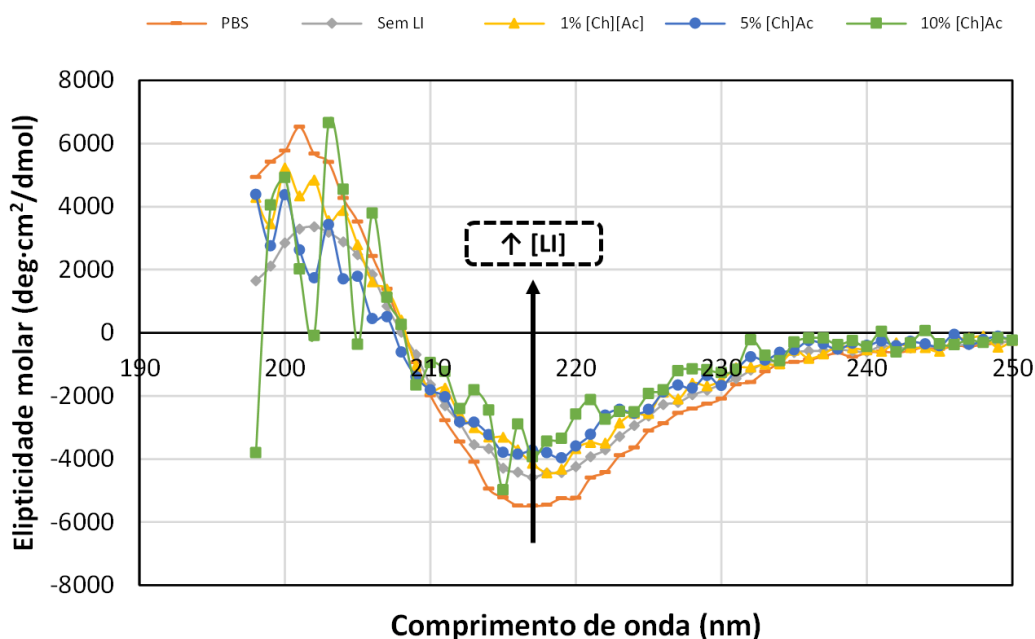


Figura 36 – Espectros de DC na região do *Far-UV* (198 – 250 nm) da IgG na sua forma nativa (em PBS) e na fase rica em PEG após a sua extração utilizando SAB constituídos por PEG + dextrano + H₂O e com diferentes concentrações de [Ch][Ac] como adjuvante.

O DC tem vindo a ser utilizado como ferramenta para investigar eventuais alterações ao nível da estrutura secundárias das proteínas, sendo que os maiores cromóforos presentes nestas são as ligações peptídicas, que absorvem a luz *Far-UV* e induzem várias transições $\pi\text{-}\pi^*$ e $n\text{-}\pi^*$, originando as bandas de DC características de várias conformações

de estrutura secundária, nomeadamente α -hélica, folha- β , volta- β e *random coil*. Qualquer alteração na orientação da cadeia carbonada da proteína irá afetar a transição ótica, indicando alterações na estrutura secundária da proteína [198, 204].

De acordo com os resultados obtidos na Figura 36, é possível constatar um espectro de DC típico de folha- β em todas as condições testadas, uma vez que se pode observar a presença de um mínimo a um comprimento de onda de cerca de 216 nm e um máximo de elipticidade molar próximo dos 200 nm. Contudo, verificou-se que os valores de elipticidade são mais negativos quando a IgG se encontra em PBS, sendo que a elipticidade no mínimo segue a seguinte tendência crescente: PBS < sem LI < 1% [Ch][Ac] < 5% [Ch][Ac] < 10% [Ch][Ac]. É importante salientar que o espectro referente à condição de 10% [Ch][Ac] apresenta bastante ruído, pelo que poderiam ter sido efetuadas mais acumulações do espectro de forma a reduzir o ruído do espectro. Apesar disso, é possível denotar esta tendência no seu espectro que nos permite afirmar que se trata da situação em que a elipticidade é maior a cerca de 216 nm, transmitindo a ideia de que a estrutura secundária sofre alterações, possuindo maior conteúdo em *random coil*. Posto isto, e no que concerne ao [Ch][Ac] é possível concluir que o aumento da concentração do LI no SAB de extração promove a perda de algum conteúdo em folha- β (maior valor de elipticidade a 216 nm), com um correspondente aumento do conteúdo em *random coil* (suportado pelos baixos valores de elipticidade abaixo de 208 nm). No entanto, o facto de se verificar em todas as situações a forma característica de uma proteína com um elevado conteúdo em folha- β (com um mínimo característico a cerca de 216 nm) permite-nos afirmar a estabilidade da IgG na presença deste LI.

As alterações do processo de extração contendo o LI [Ch][Ac] na estrutura terciária da IgG foram também investigadas através da observação das alterações na fluorescência intrínseca da IgG a um comprimento de onda de excitação de 280 nm. O espectro de emissão de fluorescência surge devido aos resíduos de aminoácidos aromáticos presentes na IgG como o triptofano (Trp), a fenilalanina (Phe) e a tirosina (Tyr), capazes de sofrer transições $n-\pi^*$. Devido essencialmente ao elevado número de resíduos de triptofano presentes na IgG, a monitorização das alterações na fluorescência intrínseca da proteína apresenta-se como um método sensível para provar alterações estruturais globais ao nível da estrutura terciária da mesma. Neste sentido, na Figura 37 encontra-se representado o espectro de emissão de fluorescência normalizado e não normalizado para a IgG em PBS (na sua forma nativa e com o seu enrolamento correto), na fase rica em PEG após uma

etapa de extração utilizando um SAB constituído por PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H₂O e na fase rica em PEG após uma etapa de extração utilizando um SAB constituído por PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H₂O + diferentes concentrações de [Ch][Ac].

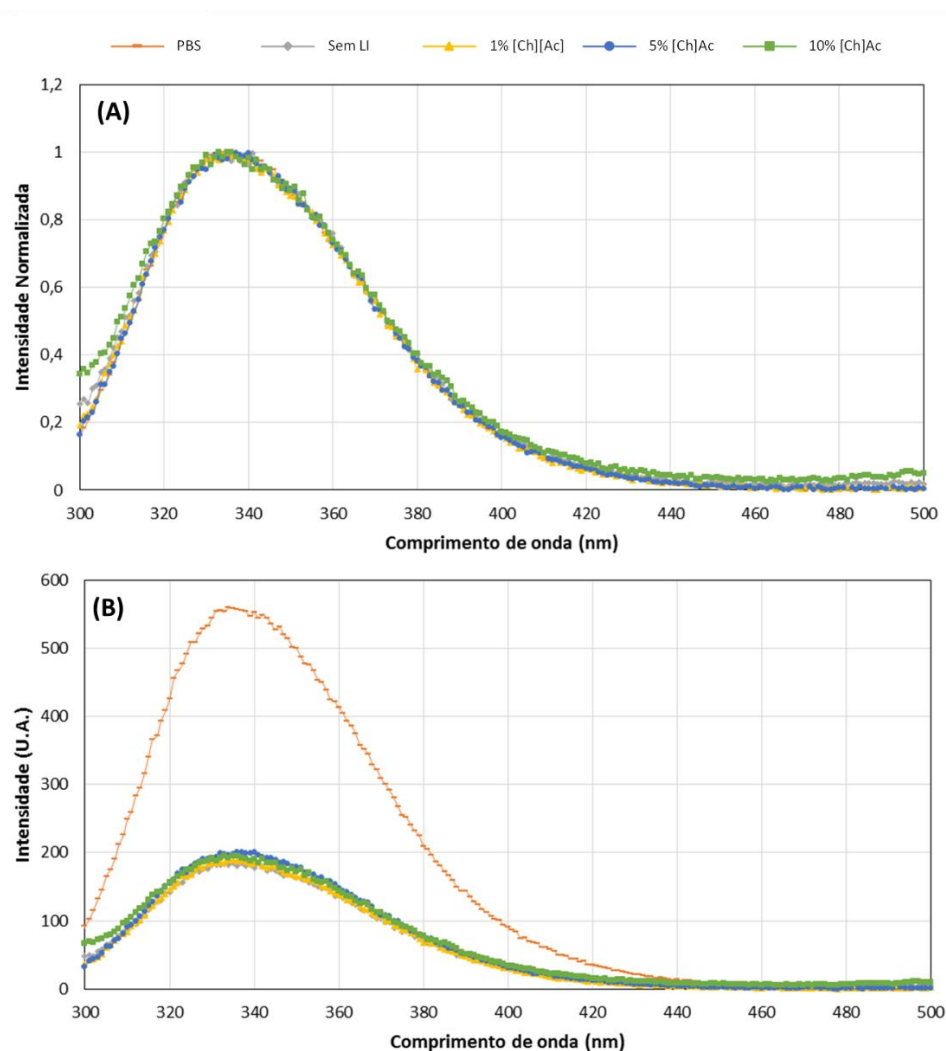


Figura 37 – Espectros de emissão de fluorescência na região compreendida entre 300 – 500 nm da IgG na sua forma nativa (em PBS) e na fase rica em PEG após a sua extração utilizando SAB constituídos por PEG + dextrano + H₂O e com diferentes concentrações de [Ch][Ac] como adjuvante: (A) Espectro de emissão de fluorescência normalizado de acordo com o comprimento de onda máximo; (B) Espectro de emissão de fluorescência não normalizado.

Através da análise da Figura 37 (A), é possível constatar que não existe nenhum desvio em termos de comprimento de onda máximo para nenhum dos espectros quando comparados com o espectro da proteína nativa em PBS. Contudo, na Figura 37 (B) em que se apresenta o espectro de emissão de fluorescência não normalizado, é possível verificar uma intensidade de fluorescência muito elevada no espectro da proteína nativa, havendo um decréscimo bastante acentuado na intensidade da IgG após a sua extração num SAB convencional polímero-polímero e nos SAB polímero-polímero contendo o LI [Ch][Ac] como adjuvante. Apesar disso, não se verificam diferenças consideráveis de intensidade

entre o espectro da proteína extraída através de SAB sem LI ou através dos SAB com diferentes concentrações de LI, pelo que não se constata a existência de um efeito notório de alteração da estrutura terciária da proteína advindo da utilização de maiores concentrações de LI. Assim sendo, a diminuição considerável da intensidade da fluorescência verificada nestes espectros comparativamente com o espectro da proteína nativa pode ser justificada por três razões principais. Em primeiro lugar, pode tratar-se de um efeito da diluição da amostra, uma vez que a partição da IgG ocorre em diferentes extensões nos diferentes SAB, de maneira que a sua diferente concentração entre amostras pode estar na origem de algumas das discrepâncias constatadas em termos de intensidade de fluorescência; seguidamente, esta pode ser resultado do *quenching* dos resíduos de Trp devido à ligação do LI na sua vizinhança; finalmente, pode significar a perda do enrolamento da proteína. Tal como reportado por Deep *et al.* [205], as alterações na intensidade da fluorescência não podem, só por si, ser consideradas como uma prova de perda do enrolamento ou do re-enrolamento das proteínas, pelo que as alterações complementares na estrutura secundária da proteína podem validar os resultados da fluorescência. De facto, uma das hipóteses apontadas para o decréscimo da fluorescência prende-se com a possibilidade de ocorrer a perda do enrolamento da IgG, e tendo em consideração os resultados discutidos anteriormente relativos à perda de elementos de estrutura secundária em folha- β para *random coil* com o aumento da concentração de LI no sistema, é possível que esta seja talvez a hipótese mais provável do efeito que o processo de extração contendo este LI apresenta na proteína de interesse, causando alguma desnaturação embora não muito acentuada, uma vez que não se verifica qualquer desvio em termos de comprimento de onda máximo para qualquer situação (e que seria um sinal evidente de um fenómeno de desnaturação da proteína).

No que diz respeito ao estudo da estabilidade da IgG na presença de $[P_{444}]Cl$, os dados obtidos através do equipamento de DC foram tratados, sendo que se apresenta na Figura 38 os resultados em unidades de eletricidade molar da IgG em PBS (na sua forma nativa e com o seu enrolamento correto), na fase rica em PEG após uma etapa de extração utilizando um SAB constituído por PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H_2O e na fase rica em PEG após uma etapa de extração utilizando um SAB constituído por PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H_2O + diferentes concentrações de $[P_{444}]Cl$.

Relativamente aos resultados obtidos na Figura 38 referente aos ensaios com o $[P_{444}]Cl$, é possível constatar um espectro de DC típico de folha- β apenas nas condições da proteína nativa e após a sua extração utilizando SAB sem LI adicionado ou com apenas

1% de LI, uma vez mais devido à presença de um mínimo a um comprimento de onda de cerca de 216 nm e um máximo de elipticidade molar próximo dos 200 nm.

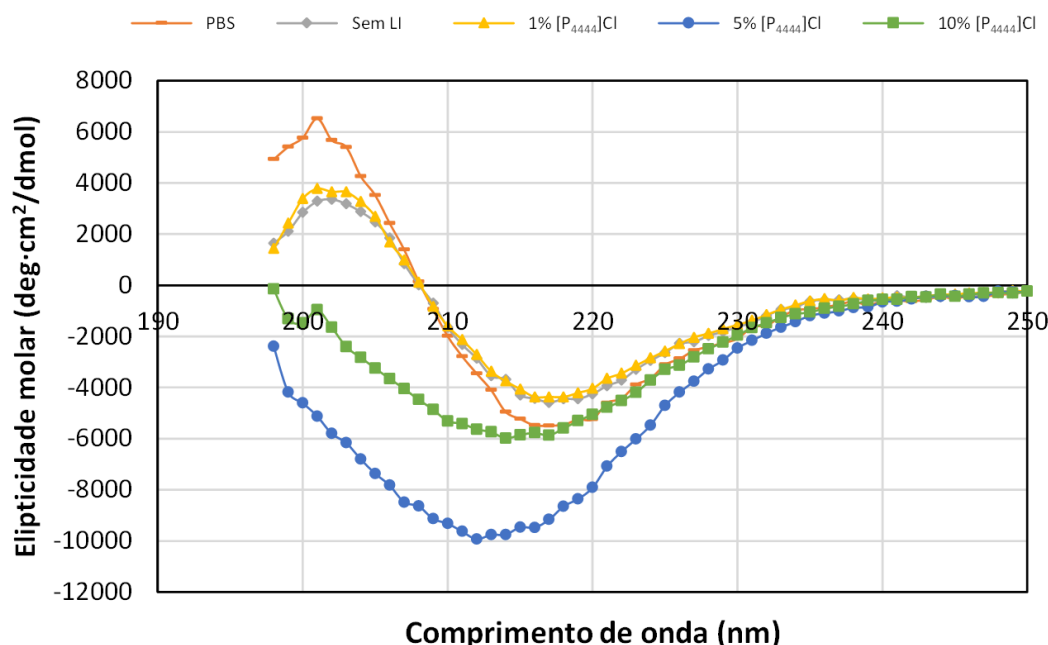


Figura 38 – Espectros de DC na região do *Far-UV* (198 – 250 nm) da IgG na sua forma nativa (em PBS) e na fase rica em PEG após a sua extração utilizando SAB constituídos por PEG + dextrano + H₂O e com diferentes concentrações de [P₄₄₄₄]Cl como adjuvante.

Com a extração utilizando SAB a IgG aparenta perder algum conteúdo de estrutura secundária em folha- β uma vez que os valores de elipticidade para estas situações são menos negativos do que na situação em que a IgG se encontra em PBS, o que representa precisamente a perda de conteúdo em folha- β . Contudo, aquando da introdução de 5% e 10% de LI ao SAB polímero-polímero, verifica-se uma mudança para valores negativos de elipticidade abaixo de 208 nm, o que significa que aumenta o conteúdo em *random coil* presente na IgG. Esta perda de elementos de estrutura secundária em folha- β pode estar relacionada com o pH do sistema, que como foi discutido anteriormente é de 2,6 e 1,7 para os sistemas contendo 5% e 10% de [P₄₄₄₄]Cl, respetivamente. De facto, já foi reportado que a exposição de imunoglobulinas a baixos valores de pH (pH < 3) leva à obtenção de uma estrutura com uma conformação estável designada de *A-state* e que é caracterizada por um elevado grau de estrutura secundária, por uma hidrofobicidade aumentada e uma tendência para que sofra lentamente um processo de agregação [206-208]. Para além disso, uma vez que as condições contendo 5% e 10% de [P₄₄₄₄]Cl apresentam uma elipticidade molar mais negativa que a apresentada pela proteína na sua conformação nativa, possivelmente significa que estamos perante uma situação de re-

enrolamento da IgG, e na qual a concentração de 5% de LI aparenta ter o maior efeito uma vez que apresenta o menor valor de elipticidade.

Uma vez mais, as alterações do processo de extração contendo agora o LI [P₄₄₄₄]Cl na estrutura terciária da IgG foram também investigadas através da observação das alterações na fluorescência intrínseca da IgG a um comprimento de onda de excitação de 280 nm. Na Figura 39 encontra-se representado o espectro de emissão de fluorescência normalizado e não normalizado para a IgG em PBS (na sua forma nativa e com o seu enrolamento correto), na fase rica em PEG após uma etapa de extração utilizando um SAB constituído por PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H₂O e na fase rica em PEG após uma etapa de extração utilizando um SAB constituído por PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H₂O + diferentes concentrações de [P₄₄₄₄]Cl.

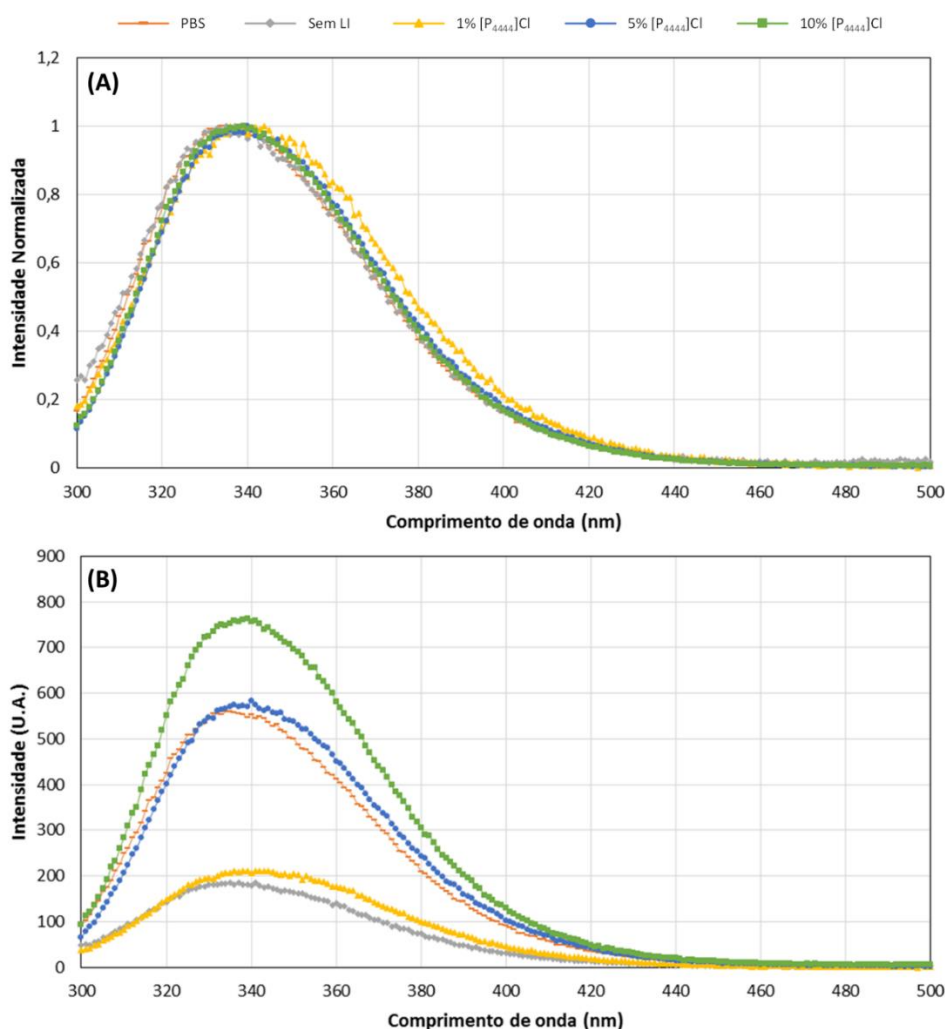


Figura 39 – Espectros de emissão de fluorescência na região compreendida entre 300 – 500 nm da IgG na sua forma nativa (em PBS) e na fase rica em PEG após a sua extração utilizando SAB constituídos por PEG + dextrano + H₂O e com diferentes concentrações de [Ch][Ac] como adjuvante: (A) Espectro de emissão de fluorescência normalizado de acordo com o comprimento de onda máximo; (B) Espectro de emissão de fluorescência não normalizado.

De acordo com os resultados obtidos na Figura 39 (A), em que é possível observar os espectros normalizados de emissão de fluorescência, verifica-se que não existem alterações consideráveis no comprimento de onda máximo nos diferentes espectros, exceto na condição contendo 1% de LI, em que se constata um ligeiro desvio do comprimento de onda de cerca de 334 nm (referente ao espectro da proteína na sua conformação nativa) para cerca de 339 nm, possivelmente resultado do estabelecimento de ligações de hidrogénio que originam esse desvio do espectro em 5 nm. Deste modo, é possível inferir que não ocorrem alterações drásticas de estrutura terciária com a utilização de concentrações mais elevadas de LI. No entanto, é possível denotar um comportamento extremamente interessante nos espectros de emissão de fluorescência não normalizados. A presença de 5% e 10% de LI no processo de extração promove o aumento da intensidade da fluorescência da IgG, que mesmo apresentando-se numa concentração inferior nestas situações (resultado do processo de extração, quer pela diluição causada pela partição da biomolécula pelas duas fases aquosas, quer pela perda de proteína por precipitação que foi visível macroscopicamente), resultou num valor de intensidade superior em ambos os casos que o obtido para a proteína em PBS. Deste modo, esta apresenta-se como uma evidência que permite corroborar e suportar os resultados referentes aos ensaios de DC nestas condições, sendo possível concluir que este LI aparenta induzir um re-enrolamento da proteína quando presente a uma concentração de, pelo menos, 5% no sistema de extração. No entanto, o efeito curioso induzido pela presença deste LI é um efeito que carece de um estudo mais aprofundado, nomeadamente através de métodos de simulação molecular, no sentido de esclarecer as interações e ligações que ocorrem entre o LI e o próprio anticorpo e que possam justificar os comportamentos díspares de precipitação/re-enrolamento do anticorpo verificados em simultâneo. Após uma análise integrada de todos os dados obtidos, foi possível concluir que o LI [Ch][Ac] demonstrou manter a estabilidade da estrutura em folha- β da IgG, induzindo contudo a perda de alguns elementos estruturais com o aumento da concentração de LI utilizado. Por sua vez, a utilização de concentrações mais elevadas de [P₄₄₄₄]Cl permitiu a ocorrência de um re-enrolamento da proteína com a utilização de pelo menos 5% de LI no sistema convencional polímero-polímero. Posto tudo isto, e naturalmente dentro das limitações experimentais, concluiu-se que a técnica de DC suportada com os dados de espectroscopia de fluorescência permitiu obter informações extremamente relevantes no que concerne à estabilidade da IgG na presença de LIs e após o processo de extração envolvendo uma etapa de SAB contendo esses mesmo LIs.

3.7. Conclusões

Tendo em consideração o enorme potencial das linhas celulares obtidas a partir de células de óvário de hamster chinês para a produção de biofármacos terapêuticos, neste trabalho foi mantida com sucesso uma cultura celular CHO DP-12 num meio 25% DMEM/ 75% ProCHOTM5 para a produção de anticorpos monoclonais IgG anti-IL-8. Através de estudos morfológicos foi caracterizada como sendo uma cultura de células aderentes, nas quais as células adquirem uma morfologia em forma de fibroblasto ao longo do tempo de cultura. No que concerne à sua proliferação, demonstrou-se a adaptação da cultura ao meio, sendo possível atingir elevadas produtividades após quatro passagens, tendo a concentração de anticorpos humanos anti-IL-8 produzidos variado entre 31 – 103 mg/L.

Com o intuito de desenvolver novas plataformas de extração e purificação para anticorpos, e em particular para a IgG, neste trabalho foram testados dois tipos maioritários de SAB integrando LIs como adjuvantes na sua constituição: SAB do tipo polímero-sal e SAB do tipo polímero-polímero. Concluiu-se que nos SAB constituídos por PEG 3350 + fosfato pH 7 + H₂O + LI, a adição de 1, 5 e 10% de LI favoreceu pouco a extração de IgG comparativamente com o sistema sem LI adicionado, pelo que estes sistemas não demonstram uma elevada potencialidade com vista à extração seletiva de IgG, devido à elevada dispersão da carga iónica dos LIs que não permite que estes sejam tão “fortes” a manipular a polaridade das fases coexistentes de um sistema contendo sais inorgânicos. Contrariamente, os sistemas compostos por PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H₂O + LI demonstraram um grande potencial para a extração seletiva e purificação de IgG. Este tipo de sistema foi caracterizados através da determinação do diagrama de fases, TLs e TLLs. Os diferentes LIs estudados permitiram inferir acerca do efeito que o catião, o anião e a concentração do LI apresentam sobre o comportamento de partição da IgG nos sistemas. Deste modo, foi possível alcançar um rendimento de extração superior a 97% utilizando um SAB constituído por PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H₂O + 10% [Ch][Ac], e é importante salientar que os sistemas PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H₂O + 15% [C₄mim]Br e PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H₂O + 20% [C₄mim]Br permitiram a extração completa da IgG numa única etapa.

Após o processo de triagem dos SAB mais adequados para a extração de IgG, procedeu-se à sua utilização como plataformas para a purificação de IgG anti-IL-8 diretamente a partir de sobrenadantes de culturas celulares CHO DP-12. Dos vários

sistemas estudados que permitiram a partição das proteínas em solução pelas duas fases aquosas coexistentes, o sistema constituído por PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H₂O + 20% [C₄mim]Br permitiu a obtenção de resultados extremamente promissores, dado indicar uma partição seletiva entre a IgG e as impurezas proteicas para fases opostas. De facto, a IgG foi extraída de uma matriz real e complexa com um rendimento de aproximadamente 82%, e com um nível de pureza de cerca de 64% em apenas uma etapa de extração. Mais ainda, provou-se a manutenção da integridade estrutural da proteína durante o processo de extração e na presença de LIs, embora seja de crucial relevância o estudo mais suportado e conclusivo do efeito específico do [C₄mim]Br na estrutura secundária/terciária da proteína. Embora não se tenha alcançado uma purificação completa da IgG num único passo de extração, no sistema destacado é claramente visível uma migração preferencial das impurezas proteicas para a fase inferior e uma retenção bastante elevada da IgG na fase superior. Deste modo, a purificação completa da IgG parece plausível através da aplicação de etapas consecutivas de separação, de maneira a remover completamente as impurezas da fase que contém o anticorpo de interesse. No entanto, torna-se fundamental a existência de algum trabalho futuro no sentido de comprovar esta possibilidade.

Assim sendo, pela primeira vez foi estudada e aplicada com sucesso a utilização de LIs como adjuvantes em SAB polímero-polímero como plataformas de purificação de IgG a partir de sobrenadantes de culturas celulares. Deste modo, é possível concluir que, neste trabalho, foi desenvolvida uma nova plataforma mais benígna, eficiente e com baixo custo associado para a purificação de IgG diretamente a partir de sobrenadantes de culturas celulares CHO, capaz de ser adotada pela indústria farmacêutica através da utilização de equipamentos de cromatografia de contra corrente (CCC) ou de cromatografia de partição centrífuga (CPC).

3.8. Trabalho futuro

Futuramente, deverão ser investigadas as eventuais interações entre o LI [P₄₄₄₄]Cl e a IgG, de maneira a ser perceptível o mecanismo molecular que leva ao “desaparecimento” da proteína nos sistemas em que é utilizado como adjuvante, nomeadamente através de estudos de espectroscopia ou simulação molecular. Mais ainda, seria relevante confirmar o seu efeito de re-enrolamento da proteína (conclusão retirada a partir dos dados de DC e espectroscopia de fluorescência) e perceber o mecanismo e as condições nas quais esse fenómeno acontece.

Relativamente à extração e purificação de IgG, futuramente deverão ser efetuados estudos complementares no sentido de verificar a capacidade do sistema constituído por PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H₂O + 20% [C₄mim]Br para purificar IgG através de várias etapas sucessivas de extração. Para além disso, devem ser conduzidos estudos relativos à manutenção/alteração da estrutura secundária e terciária da proteína neste sistema de extração, nomeadamente por FTIR e espectroscopia de fluorescência, respetivamente. É também relevante determinar a atividade específica do anticorpo anti-IL-8 após a etapa de extração através de técnicas de ELISA. Não obstante, devem também ser conduzidas investigações no sentido de provar o *scale-up* deste sistema, nomeadamente através da utilização de CPC, advindo daí a vantagem adicional de ser possível aumentar ainda mais o nível de pureza da IgG numa única corrida. Também será conveniente estudar a possibilidade de reciclar o SAB utilizado, visando a redução dos custos aliado ao desenvolvimento de uma técnica mais sustentável.

Para além disso, alguns dos SAB estudados neste trabalho devem ser estudados novamente, de forma a tentar potenciar a sua utilização como plataformas de extração/purificação através da introdução de alguns ajustes na sua composição, nomeadamente com a adição de outras concentrações de LIs como adjuvantes, ou utilizando diferentes concentrações de PEG/dextrano.

No futuro, dever-se-á explorar a utilização de LIs mais benignos, biocompatíveis e provenientes de fontes renováveis, tais como os derivados de aminoácidos (como a betaína e a glicina) e de hidratos de carbono, introduzidos nos SAB como adjuvantes ou mesmo como componentes formadores de fases.

Finalmente, o SAB que se destacou neste trabalho pode também ser recomendado para a extração e purificação de outros biofármacos, nomeadamente para ácidos nucleicos ou proteínas recombinantes.

4. Referências

1. J. Kovacs-Nolan and Y. Mine, *Egg yolk antibodies for passive immunity*. Annual review of food science and technology, 2012. **3**: p. 163-182.
2. P. Rosa, I. Ferreira, A. Azevedo, and M. Aires-Barros, *Aqueous two-phase systems: a viable platform in the manufacturing of biopharmaceuticals*. Journal of Chromatography A, 2010. **1217**(16): p. 2296-2305.
3. G. Guiochon and L.A. Beaver, *Separation science is the key to successful biopharmaceuticals*. Journal of Chromatography A, 2011. **1218**(49): p. 8836-8858.
4. A.M. Azevedo, P.A. Rosa, I.F. Ferreira, and M.R. Aires-Barros, *Chromatography-free recovery of biopharmaceuticals through aqueous two-phase processing*. Trends in biotechnology, 2009. **27**(4): p. 240-247.
5. J. Kovacs-Nolan and Y. Mine, *Avian egg antibodies: basic and potential applications*. Avian and Poultry Biology Reviews, 2004. **15**(1): p. 25-46.
6. S.S. Farid, *Process economics of industrial monoclonal antibody manufacture*. Journal of Chromatography B, 2007. **848**(1): p. 8-18.
7. S.D. Jones, F.J. Castillo, and H.L. Levine, *Advances in the development of therapeutic monoclonal antibodies*. BioPharm International, 2007. **20**(10): p. 96-114.
8. U. Gottschalk, *Bioseparation in antibody manufacturing: the good, the bad and the ugly*. Biotechnology progress, 2008. **24**(3): p. 496-503.
9. J. Thömmes and M. Etzel, *Alternatives to chromatographic separations*. Biotechnology progress, 2007. **23**(1): p. 42-45.
10. A.A. Shukla, B. Hubbard, T. Tressel, S. Guhan, and D. Low, *Downstream processing of monoclonal antibodies—application of platform approaches*. Journal of Chromatography B, 2007. **848**(1): p. 28-39.
11. H.F. Liu, J. Ma, C. Winter, and R. Bayer. *Recovery and purification process development for monoclonal antibody production*. In: MAbs. Taylor & Francis, 2010. **5**(10): p. 480-499.
12. P. Marichal-Gallardo and M. Alvarez, *State-of-the-art in downstream processing of monoclonal antibodies: Process trends in design and validation*. Biotechnology progress, 2012. **28**(4): p. 899-916.
13. F. Li, J.X. Zhou, X. Yang, T. Tressel, and B. Lee, *Current therapeutic antibody production and process optimization*. Bioprocessing journal, 2007. **5**(4): p. 16.
14. M.R. Almeida, H. Passos, M.M. Pereira, Á.S. Lima, J.A. Coutinho, and M.G. Freire, *Ionic liquids as additives to enhance the extraction of antioxidants in aqueous two-phase systems*. Separation and Purification Technology, 2014. **128**: p. 1-10.
15. M.V. Quental, M. Caban, M.M. Pereira, P. Stepnowski, J.A. Coutinho, and M.G. Freire, *Enhanced extraction of proteins using cholinium-based ionic liquids as*

- phase-forming components of aqueous biphasic systems*. Biotechnology journal, 2015. **10**(9): p. 1457-1466.
16. R.L. Souza, S.P. Ventura, C.M. Soares, J.A. Coutinho, and Á.S. Lima, *Lipase purification using ionic liquids as adjuvants in aqueous two-phase systems*. Green Chemistry, 2015. **17**(5): p. 3026-3034.
 17. T.B. Dinis, H. Passos, D.L. Lima, V.I. Esteves, J.A. Coutinho, and M.G. Freire, *One-step extraction and concentration of estrogens for an adequate monitoring of wastewater using ionic-liquid-based aqueous biphasic systems*. Green Chemistry, 2015. **17**(4): p. 2570-2579.
 18. S. Raja, V.R. Murty, V. Thivaharan, V. Rajasekar, and V. Ramesh, *Aqueous two phase systems for the recovery of biomolecules – a review*. Science and Technology, 2011. **1**(1): p. 7-16.
 19. G. Kretzmer, *Industrial processes with animal cells*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002. **59**(2-3): p. 135-142.
 20. G. Goldstein, A.J. Fuccello, D.J. Norman, C.F. Shield III, R.B. Colvin, and A.B. Cosimi, *OKT3 monoclonal antibody plasma levels during therapy and the subsequent development of host antibodies to OKT3*. Transplantation, 1986. **42**(5): p. 507-510.
 21. G. Walsh, *Biopharmaceuticals: biochemistry and biotechnology*. 2013: John Wiley & Sons.
 22. G. Walsh, *Biopharmaceutical benchmarks*. Nature biotechnology, 2000. **18**(8): p. 829-834.
 23. M.F. Silva, A. Fernandes-Platzgummer, M.R. Aires-Barros, and A.M. Azevedo, *Integrated purification of monoclonal antibodies directly from cell culture medium with aqueous two-phase systems*. Separation and Purification Technology, 2014. **132**: p. 330-335.
 24. N.S. Lipman, L.R. Jackson, L.J. Trudel, and F. Weis-Garcia, *Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources*. ILAR journal, 2005. **46**(3): p. 258-268.
 25. D.M. Ecker, S.D. Jones, and H.L. Levine. *The therapeutic monoclonal antibody market*. In: MAbs. Taylor & Francis, 2015. **1**(7): p. 9-14.
 26. Datamonitor, *Prescription pharmaceutical sales overview – Analysis of forecast sales in the major pharmaceutical markets*.
 27. Research and Markets, *Global and chinese monoclonal antibody industry report, 2013-2017, China*. 2013.
 28. U.S. Food and Drug Administration. [cited 10-10-2015]; Available from: <http://www.fda.gov/>.
 29. E. Jain and A. Kumar, *Upstream processes in antibody production: evaluation of critical parameters*. Biotechnology advances, 2008. **26**(1): p. 46-72.
 30. M.D. Costioli, C. Guillemot-Potelle, C. Mitchell-Logean, and H. Broly, *Cost of goods modeling and quality by design for developing cost-effective processes*. BioPharm International, 2010. **23**(6).
 31. A. Biosciences, *Antibody purification handbook*. Edition AC, 2002: p. 10-18.

32. L.A. Moran, H.R. Horton, K.G. Scrimgeour, and M.D. Perry, *Principles of biochemistry*. 2012: Pearson.
33. A.K. Abbas, A.H. Lichtman, and S. Pillai, *Cellular and molecular immunology*. 2014: Elsevier Health Sciences.
34. S.J. Kim, Y. Park, and H.J. Hong, *Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies*. Mol Cells, 2005. **20**(1): p. 17-29.
35. T.T. Hansel, H. Kropshofer, T. Singer, J.A. Mitchell, and A.J. George, *The safety and side effects of monoclonal antibodies*. Nature reviews Drug discovery, 2010. **9**(4): p. 325-338.
36. K.D. Elgert, *Immunology: understanding the immune system*. 2009: John Wiley & Sons.
37. M. Leenaars and C.F. Hendriksen, *Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations*. Ilar Journal, 2005. **46**(3): p. 269-279.
38. P. Nelson, G. Reynolds, E. Waldron, E. Ward, K. Giannopoulos, and P. Murray, *Demystified...: monoclonal antibodies*. Molecular Pathology, 2000. **53**(3): p. 111.
39. *Animal welfare information center newsletter, Winter 1997/1998*. **8**: p. 3-4.
40. Y. Wang, A. Lomakin, R.F. Latypov, J.P. Laubach, T. Hideshima, P.G. Richardson, N.C. Munshi, K.C. Anderson, and G.B. Benedek, *Phase transitions in human IgG solutions*. The Journal of chemical physics, 2013. **139**(12): p. 121904.
41. T.R. Penha, E.R. Krüger, V. Thomaz-Soccol, J.V.B. Agottani, F.H. Itano, L.D.C. Troiano, and J. Brodzinski, *Production and characterization of monoclonal antibodies anti fragment Fc of bovine IgG*. Brazilian Archives of Biology and Technology, 2010. **53**(1): p. 105-114.
42. K. Monkos and B. Turczynski, *A comparative study on viscosity of human, bovine and pig IgG immunoglobulins in aqueous solutions*. International journal of biological macromolecules, 1999. **26**(2): p. 155-159.
43. J.A. Owen, J. Punt, S.A. Stranford, and P.P. Jones, *Kuby immunology*. 2013: WH Freeman New York.
44. M. Dąbkowska and Z. Adamczyk, *Mechanism of immunoglobulin G adsorption on mica-AFM and electrokinetic studies*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2014. **118**: p. 57-64.
45. B.V. Ayyar, S. Arora, C. Murphy, and R. O'Kennedy, *Affinity chromatography as a tool for antibody purification*. Methods, 2012. **56**(2): p. 116-129.
46. E.W. Gelfand, *Differences between IGIV products: impact on clinical outcome*. International immunopharmacology, 2006. **6**(4): p. 592-599.
47. I. Nikolayenko, O.Y. Galkin, N. Grabchenko, and M.Y. Spivak, *Preparation of highly purified human IgG, IgM, and IgA for immunization and immunoanalysis*. Ukrainica Bioorganica Acta, 2005. **2**(2): p. 3-11.
48. I.T.L. Bresolin, M.C.M. De Souza, and S.M.A. Bueno, *A new process of IgG purification by negative chromatography: Adsorption aspects of human serum*

- proteins onto ω -aminodecyl-agarose*. Journal of Chromatography B, 2010. **878**(23): p. 2087-2093.
49. A. Zhiqiang, *Antibody therapeutics—a mini review*. Trends in Bio/Pharmaceutical Industry, 2008. **2**: p. 24-29.
 50. A. Subramanian, *Immunoaffinity chromatography*. Molecular Biotechnology, 2002. **20**(1): p. 41-47.
 51. F. Nimmerjahn and J.V. Ravetch, *Anti-inflammatory actions of intravenous immunoglobulin*. Annual Review of Immunology, 2008. **26**: p. 513-533.
 52. J.R. Birch and A.J. Racher, *Antibody production*. Advanced drug delivery reviews, 2006. **58**(5): p. 671-685.
 53. G. Köhler and C. Milstein, *Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion*. European journal of immunology, 1976. **6**(7): p. 511-519.
 54. K.P. Jayapal, K.F. Wlaschin, W. Hu, and M.G. Yap, *Recombinant protein therapeutics from CHO cells-20 years and counting*. Chemical Engineering Progress, 2007. **103**(10): p. 40.
 55. H.M. Motiwala, B. Varshney, and R. Mody, *Developing an alternate host for production of biosimilar anti-EGFR monoclonal antibody*. International journal of pharmacy and biological science, 2012. **2**(4): p. 90-100.
 56. N.A. Buss, S.J. Henderson, M. McFarlane, J.M. Shenton, and L. de Haan, *Monoclonal antibody therapeutics: history and future*. Current opinion in pharmacology, 2012. **12**(5): p. 615-622.
 57. M. Stern and R. Herrmann, *Overview of monoclonal antibodies in cancer therapy: present and promise*. Critical reviews in oncology/hematology, 2005. **54**(1): p. 11-29.
 58. G.L. Boulianne, N. Hozumi, and M.J. Shulman, *Production of functional chimaeric mouse/human antibody*. Nature, 1984. **312**(5995): p. 643-646.
 59. S.L. Morrison, M.J. Johnson, L.A. Herzenberg, and V.T. Oi, *Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1984. **81**(21): p. 6851-6855.
 60. P.T. Jones, P.H. Dear, J. Foote, M.S. Neuberger, and G. Winter, *Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse*. Nature, 1986. **321**(6069): p. 522-525.
 61. P. Carter, *Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies*. Nature Reviews Cancer, 2001. **1**(2): p. 118-129.
 62. M. Yamashita, Y. Katakura, and S. Shirahata, *Recent advances in the generation of human monoclonal antibody*. Cytotechnology, 2007. **55**(2-3): p. 55-60.
 63. C. Chan, A. Chan, B. Hanson, and E. Ooi, *The use of antibodies in the treatment of infectious diseases*. Singapore medical journal, 2009. **50**(7): p. 663-72; quiz 673.
 64. E. Laffly and R. Sodoyer, *Monoclonal and recombinant antibodies, 30 years after*. Human antibodies, 2005. **14**(1/2): p. 33.

65. F. Li, N. Vijayasankaran, A. Shen, R. Kiss, and A. Amanullah. *Cell culture processes for monoclonal antibody production*. In: MAbs. Taylor & Francis, 2010. **2**(5): p. 466-479.
66. M. Butler and A. Meneses-Acosta, *Recent advances in technology supporting biopharmaceutical production from mammalian cells*. Applied microbiology and biotechnology, 2012. **96**(4): p. 885-894.
67. J.-H. Tjio and T.T. Puck, *Genetics of somatic mammalian cells: II. Chromosomal constitution of cells in tissue culture*. The Journal of experimental medicine, 1958. **108**(2): p. 259.
68. F.M. Wurm, *Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells*. Nature biotechnology, 2004. **22**(11): p. 1393-1398.
69. L. Fan, I. Kadura, L.E. Krebs, J.L. Larson, D.M. Bowden, and C.C. Frye, *Development of a highly-efficient CHO cell line generation system with engineered SV40E promoter*. Journal of biotechnology, 2013. **168**(4): p. 652-658.
70. A.R. Costa, M.E. Rodrigues, M. Henriques, J. Azeredo, and R. Oliveira, *Guidelines to cell engineering for monoclonal antibody production*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2010. **74**(2): p. 127-138.
71. M.M. Zhu, A. Goyal, D.L. Rank, S.K. Gupta, T.V. Boom, and S.S. Lee, *Effects of elevated pCO₂ and osmolality on growth of CHO cells and production of antibody-fusion protein B1: A case study*. Biotechnology progress, 2005. **21**(1): p. 70-77.
72. M. Wiebe, F. Becker, R. Lazar, L. May, B. Casto, M. Semense, and C. Fautz, *A multifaceted approach to assure that recombinant tPA is free of adventitious virus*. Developments in biological standardization, 1989. **70**: p. 147.
73. K.N. Baker, M.H. Rendall, A.E. Hills, M. Hoare, R.B. Freedman, and D.C. James, *Metabolic control of recombinant protein N-glycan processing in NS0 and CHO cells*. Biotechnology and bioengineering, 2001. **73**(3): p. 188-202.
74. K. Swiech, V. Picanço-Castro, and D.T. Covas, *Human cells: new platform for recombinant therapeutic protein production*. Protein expression and purification, 2012. **84**(1): p. 147-153.
75. M. Kuczewski, E. Schirmer, B. Lain, and G. Zarbis-Papastoitsis, *A single-use purification process for the production of a monoclonal antibody produced in a PER. C6 human cell line*. Biotechnology journal, 2011. **6**(1): p. 56-65.
76. S.C. Ho, Y.W. Tong, and Y. Yang, *Generation of monoclonal antibody-producing mammalian cell lines*. Pharmaceutical Bioprocessing, 2013. **1**(1): p. 71-87.
77. G. Urlaub and L.A. Chasin, *Isolation of chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1980. **77**(7): p. 4216-4220.
78. J. Chusainow, Y.S. Yang, J.H. Yeo, P.C. Toh, P. Asvadi, N.S. Wong, and M.G. Yap, *A study of monoclonal antibody-producing CHO cell lines: What makes a stable high producer?* Biotechnology and bioengineering, 2009. **102**(4): p. 1182-1196.
79. C. Bebbington, G. Renner, S. Thomson, D. King, D. Abrams, and G. Yarranton, *High-level expression of a recombinant antibody from myeloma cells using a*

- glutamine synthetase gene as an amplifiable selectable marker*. Nature Biotechnology, 1992. **10**(2): p. 169-175.
80. M. Brown, G. Renner, R. Field, and T. Hassell, *Process development for the production of recombinant antibodies using the glutamine synthetase (GS) system*. Cytotechnology, 1992. **9**(1-3): p. 231-236.
 81. N. Kumar and N. Borth, *Flow-cytometry and cell sorting: an efficient approach to investigate productivity and cell physiology in mammalian cell factories*. Methods, 2012. **56**(3): p. 366-374.
 82. J. Zhang, *Mammalian cell culture for biopharmaceutical production*, in *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2010. p. 157-178.
 83. S. Ozturk and W.-S. Hu, *Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies*. 2005: CRC Press.
 84. A. Meenakshi, *Cell culture media: A review*. MATER METHODS, 2013. **175**: p. 3.
 85. S. Grosvenor, *The role of media development in process optimization: an historical perspective*. Biopharm international, 2008. **8**: p. 28-36.
 86. D. Galbraith, *Transmissible spongiform encephalopathies and tissue cell culture*. Cytotechnology, 2002. **39**(2): p. 117-124.
 87. O.-W. Merten, *Virus contaminations of cell cultures—a biotechnological view*. Cytotechnology, 2002. **39**(2): p. 91-116.
 88. S.E. Broedel Jr and S. Papiak, *The case for serum-free media*. BioProcess International, 2003. **1**: p. 56 - 58.
 89. J. Dempsey, S. Ruddock, M. Osborne, A. Ridley, S. Sturt, and R. Field, *Improved fermentation processes for NS0 cell lines expressing human antibodies and glutamine synthetase*. Biotechnology progress, 2003. **19**(1): p. 175-178.
 90. R. Rohwer, *Analysis of risk to biomedical products developed from animal sources (with special emphasis on the spongiform encephalopathy agents, scrapie and BSE)*. Developments in biological standardization, 1995. **88**: p. 247-256.
 91. K. Hellman, J. Honstead, and C. Vincent, *Adventitious agents from animal-derived raw materials and production systems*. Developments in biological standardization, 1995. **88**: p. 231-234.
 92. O. Merten, *Safety issues of animal products used in serum-free media*. Developments in biological standardization, 1998. **99**: p. 167-180.
 93. J. Zhang and D. Robinson, *Development of animal-free, protein-free and chemically-defined media for NS0 cell culture*. Cytotechnology, 2005. **48**(1-3): p. 59-74.
 94. D. Jayme, *An animal origin perspective of common constituents of serum-free medium formulations*. Developments in biological standardization, 1998. **99**: p. 181-187.
 95. M. Zang‘vz, C.G. Helmut Trautmann, F. Messi‘v, F. Asselbergsz, and A. Fiechter, *Hamster ovary cells using a protein—free cell culture medium*. Bio/technology, 1995. **13**: p. 389.

96. M. Schröder, K. Matischak, and P. Friedl, *Serum-and protein-free media formulations for the Chinese hamster ovary cell line DUKXB11*. Journal of biotechnology, 2004. **108**(3): p. 279-292.
97. S. Sommerfeld and J. Strube, *Challenges in biotechnology production—generic processes and process optimization for monoclonal antibodies*. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, 2005. **44**(10): p. 1123-1137.
98. D.X. Zhao, R. Fike, B. Naumovich, and M. Stramaglia, *Improving protein production in CHO cells*. Biopharm International, 2008. **1**: p. 22-27.
99. L. Dimasi, *Meeting increased demands on cell-based processes by using defined media supplements*. BioProcess International, 2011. **9**: p. 48-57.
100. I.F. Pinto, S.A. Rosa, M.R. Aires-Barros, and A.M. Azevedo, *Exploring the use of heparin as a first capture step in the purification of monoclonal antibodies from cell culture supernatants*. Biochemical Engineering Journal, 2015. **104**: p. 27-33.
101. B. Kelley. *Industrialization of mAb production technology: the bioprocessing industry at a crossroads*. In: MAbs. Taylor & Francis, 2009. **1**(5): p. 443-452..
102. A. Jacobi, B. Enenkel, P. Garidel, C. Eckermann, M. Knappenberger, I. Presser, and H. Kaufmann, *Process development and manufacturing of therapeutic antibodies*. Handbook of Therapeutic Antibodies, 2014: p. 601-664.
103. K. Swinnen, A. Krul, I. Van Goidsenhoven, N. Van Tichelt, A. Roosen, and K. Van Houdt, *Performance comparison of protein A affinity resins for the purification of monoclonal antibodies*. Journal of Chromatography B, 2007. **848**(1): p. 97-107.
104. H. Hjelm, K. Hjelm, and J. Sjöquist, *Protein A from Staphylococcus aureus. Its isolation by affinity chromatography and its use as an immunosorbent for isolation of immunoglobulins*. FEBS letters, 1972. **28**(1): p. 73-76.
105. J. Deisenhofer, *Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from Staphylococcus aureus at 2.9-and 2.8-Å resolution*. Biochemistry, 1981. **20**(9): p. 2361-2370.
106. A.C. Roque, C.S. Silva, and M.Â. Taipa, *Affinity-based methodologies and ligands for antibody purification: advances and perspectives*. Journal of Chromatography A, 2007. **1160**(1): p. 44-55.
107. K. Eriksson, A. Ljunglöf, G. Rodrigo, and E. Brekkan, *mAb contaminant removal with a multimodal anion exchanger*. BioProcess International, 2009.
108. G. Bolton, J. Cormier, M. Krishnan, J. Lewnard, and H. Lutz, *Integrity testing of normal flow parvovirus filters using air-liquid based tests*. Bioprocessing Journal, 2006. **5**(1): p. 50.
109. D.M. Strauss, J. Gorrell, M. Plancarte, G.S. Blank, Q. Chen, and B. Yang, *Anion exchange chromatography provides a robust, predictable process to ensure viral safety of biotechnology products*. Biotechnology and bioengineering, 2009. **102**(1): p. 168-175.
110. L. Connell-Crowley, T. Nguyen, J. Bach, S. Chinniah, H. Bashiri, R. Gillespie, J. Moscariello, P. Hinckley, H. Dehghani, and S. Vunnum, *Cation exchange*

- chromatography provides effective retrovirus clearance for antibody purification processes.* Biotechnology and bioengineering, 2012. **109**(1): p. 157-165.
111. D.K. Follman and R.L. Fahrner, *Factorial screening of antibody purification processes using three chromatography steps without protein A.* Journal of Chromatography A, 2004. **1024**(1): p. 79-85.
 112. A.M. Clausen, A. Subramanian, and P.W. Carr, *Purification of monoclonal antibodies from cell culture supernatants using a modified zirconia based cation-exchange support.* Journal of Chromatography A, 1999. **831**(1): p. 63-72.
 113. Y. Hou, M. Brower, D. Kanani, R. Jacquemart, B. Kachuik, D. Pollard, and J. Stout, *Advective hydrogel membrane chromatography for monoclonal antibody purification in bioprocessing.* Biotechnology Progress, 2015. **31**(4): p. 974-982.
 114. R. Ghosh and L. Wang, *Purification of humanized monoclonal antibody by hydrophobic interaction membrane chromatography.* Journal of Chromatography A, 2006. **1107**(1): p. 104-109.
 115. R. Giovannini and R. Freitag, *Isolation of a recombinant antibody from cell culture supernatant: Continuous annular versus batch and expanded-bed chromatography.* Biotechnology and bioengineering, 2001. **73**(6): p. 522-529.
 116. Y. González, N. Ibarra, H. Gómez, M. González, L. Dorta, S. Padilla, and R. Valdés, *Expanded bed adsorption processing of mammalian cell culture fluid: comparison with packed bed affinity chromatography.* Journal of Chromatography B, 2003. **784**(1): p. 183-187.
 117. S. Lim, H. Manus, A. Gooley, K. Williams, and D. Rylatt, *Purification of monoclonal antibodies from ascitic fluid using preparative electrophoresis.* Journal of Chromatography A, 1998. **827**(2): p. 329-335.
 118. T. Thomas, E. Shave, I. Bate, S. Gee, S. Franklin, and D. Rylatt, *Preparative electrophoresis: a general method for the purification of polyclonal antibodies.* Journal of Chromatography A, 2002. **944**(1): p. 161-168.
 119. L.R. Castilho, F.B. Anspach, and W.-D. Deckwer, *Comparison of affinity membranes for the purification of immunoglobulins.* Journal of membrane science, 2002. **207**(2): p. 253-264.
 120. G. Serpa, E.F.P. Augusto, W.M.S.C. Tamashiro, M.B. Ribeiro, E.A. Miranda, and S.M.A. Bueno, *Evaluation of immobilized metal membrane affinity chromatography for purification of an immunoglobulin G 1 monoclonal antibody.* Journal of Chromatography B, 2005. **816**(1): p. 259-268.
 121. M.Â. Taipa, R.-H. Kaul, B. Mattiasson, and J.M. Cabral, *Recovery of a monoclonal antibody from hybridoma culture supernatant by affinity precipitation with Eudragit S-100.* Bioseparation, 2000. **9**(5): p. 291-298.
 122. M. Dainiak, V. Izumrudov, V. Muronetz, I.Y. Galaev, and B. Mattiasson, *Affinity precipitation of monoclonal antibodies by nonstoichiometric polyelectrolyte complexes.* Bioseparation, 1998. **7**(4-5): p. 231-240.
 123. M.W. Handlogten, J.F. Stefanick, P.E. Deak, and B. Bilgicer, *Affinity-based precipitation via a bivalent peptidic hapten for the purification of monoclonal antibodies.* Analyst, 2014. **139**(17): p. 4247-4255.

124. K. Holschuh and A. Schwämmle, *Preparative purification of antibodies with protein A — an alternative to conventional chromatography*. Journal of magnetism and magnetic materials, 2005. **293**(1): p. 345-348.
125. L. Borlido, L. Moura, A.M. Azevedo, A.C. Roque, M.R. Aires-Barros, and J.P.S. Farinha, *Stimuli-responsive magnetic nanoparticles for monoclonal antibody purification*. Biotechnology journal, 2013. **8**(6): p. 709-717.
126. P. Gagnon, P. Toh, and J. Lee, *High productivity purification of immunoglobulin G monoclonal antibodies on starch-coated magnetic nanoparticles by steric exclusion of polyethylene glycol*. Journal of Chromatography A, 2014. **1324**: p. 171-180.
127. T. Müller-Späth, L. Aumann, G. Ströhlein, and M. Morbidelli, *Improvement of specific monoclonal antibody (mAb) activity by reduction of the mAb heterogeneity using continuous chromatography (MCSGP)*. New Biotechnology, 2009. **25**: p. S187.
128. K. Raghavarao, N. Rastogi, M. Gowthaman, and N. Karanth, *Aqueous two-phase extraction for downstream processing of enzymes/proteins*. Advances in applied microbiology, 1995. **41**: p. 97-171.
129. B. Sivasankar, *Bioseparations: principles and techniques*. 2005: PHI Learning Pvt. Ltd.
130. N.J. Bridges, K.E. Gutowski, and R.D. Rogers, *Investigation of aqueous biphasic systems formed from solutions of chaotropic salts with kosmotropic salts (salt–salt ABS)*. Green Chemistry, 2007. **9**(2): p. 177-183.
131. M. Beijerinck, *Kulturversuche mit amoeben auf festem substrate*. Centralb. f. Bakteriöl., Orig, 1896. **19**: p. 257-267.
132. P.-Å. Albertsson, *Partition of cell particles and macromolecules: separation and purification of biomolecules, cell organelles, membranes, and cells in aqueous polymer two-phase systems and their use in biochemical analysis and biotechnology*. Vol. 346. 1986: Wiley New York etc.
133. M.G. Freire, A.F.M. Claudio, J.M. Araujo, J.A. Coutinho, I.M. Marrucho, J.N.C. Lopes, and L.P.N. Rebelo, *Aqueous biphasic systems: a boost brought about by using ionic liquids*. Chemical Society Reviews, 2012. **41**(14): p. 4966-4995.
134. R. Hatti-Kaul, *Aqueous two-phase systems: methods and protocols*. Vol. 11. 2000: Springer Science & Business Media.
135. P.A. Rosa, A.M. Azevedo, and M.R. Aires-Barros, *Application of central composite design to the optimisation of aqueous two-phase extraction of human antibodies*. Journal of Chromatography A, 2007. **1141**(1): p. 50-60.
136. M. Bensch, B. Selbach, and J. Hubbuch, *High throughput screening techniques in downstream processing: preparation, characterization and optimization of aqueous two-phase systems*. Chemical engineering science, 2007. **62**(7): p. 2011-2021.
137. J.A. Asenjo and B.A. Andrews, *Aqueous two-phase systems for protein separation: phase separation and applications*. Journal of Chromatography A, 2012. **1238**: p. 1-10.

138. M.G. Freire, J.F. Pereira, M. Francisco, H. Rodríguez, L.P.N. Rebelo, R.D. Rogers, and J.A. Coutinho, *Insight into the interactions that control the phase behaviour of new aqueous biphasic systems composed of polyethylene glycol polymers and ionic liquids*. Chemistry-A European Journal, 2012. **18**(6): p. 1831-1839.
139. J.L. Cleland, C. Hedgepeth, and D. Wang, *Polyethylene glycol enhanced refolding of bovine carbonic anhydrase B. Reaction stoichiometry and refolding model*. Journal of Biological Chemistry, 1992. **267**(19): p. 13327-13334.
140. A.L. Grilo, M.R. Aires-Barros, and A.M. Azevedo, *Partitioning in aqueous two-phase systems: fundamentals, applications and trends*. Separation & Purification Reviews, 2014. **45**(1): p. 68-80.
141. B. Andrews, D. Head, P. Dunthorne, and J. Asenjo, *PEG activation and ligand binding for the affinity partitioning of proteins in aqueous two-phase systems*. Biotechnology techniques, 1990. **4**(1): p. 49-54.
142. B. Sulk, G. Birkenmeier, and G. Kopperschläger, *Application of phase partitioning and thiophilic adsorption chromatography to the purification of monoclonal antibodies from cell culture fluid*. Journal of immunological methods, 1992. **149**(2): p. 165-171.
143. B. Andrews, S. Nielsen, and J. Asenjo, *Partitioning and purification of monoclonal antibodies in aqueous two-phase systems*. Bioseparation, 1995. **6**(5): p. 303-313.
144. G. Zijlstra, M. Michielsen, C. De Gooijer, L. Van der Pol, and J. Tramper, *Separation of hybridoma cells from their IgG product using aqueous two-phase systems*. Bioseparation, 1996. **6**(4): p. 201-210.
145. G. Zijlstra, M. Michielsen, C. De Gooijer, L. Van der Pol, and J. Tramper, *IgG and hybridoma partitioning in aqueous two-phase systems containing a dye-ligand*. Bioseparation, 1998. **7**(2): p. 117-126.
146. M. Rito-Palomares, C. Dale, and A. Lyddiatt, *Generic application of an aqueous two-phase process for protein recovery from animal blood*. Process Biochemistry, 2000. **35**(7): p. 665-673.
147. A.M. Azevedo, P.A. Rosa, I.F. Ferreira, and M.R. Aires-Barros, *Optimisation of aqueous two-phase extraction of human antibodies*. Journal of biotechnology, 2007. **132**(2): p. 209-217.
148. P. Rosa, A. Azevedo, S. Sommerfeld, M. Mutter, M. Aires-Barros, and W. Bäcker, *Application of aqueous two-phase systems to antibody purification: a multi-stage approach*. Journal of biotechnology, 2009. **139**(4): p. 306-313.
149. P. Rosa, A. Azevedo, S. Sommerfeld, W. Bäcker, and M. Aires-Barros, *Continuous aqueous two-phase extraction of human antibodies using a packed column*. Journal of Chromatography B, 2012. **880**: p. 148-156.
150. D. Silva, A. Azevedo, P. Fernandes, V. Chu, J. Conde, and M. Aires-Barros, *Design of a microfluidic platform for monoclonal antibody extraction using an aqueous two-phase system*. Journal of Chromatography A, 2012. **1249**: p. 1-7.
151. A. Azevedo, P. Rosa, I. Ferreira, and M. Aires-Barros, *Integrated process for the purification of antibodies combining aqueous two-phase extraction, hydrophobic*

- interaction chromatography and size-exclusion chromatography*. Journal of Chromatography A, 2008. **1213**(2): p. 154-161.
152. A.M. Azevedo, A.G. Gomes, P.A. Rosa, I.F. Ferreira, A.M. Pisco, and M.R. Aires-Barros, *Partitioning of human antibodies in polyethylene glycol–sodium citrate aqueous two-phase systems*. Separation and Purification Technology, 2009. **65**(1): p. 14-21.
 153. I.F. Ferreira, A.M. Azevedo, P.A. Rosa, and M.R. Aires-Barros, *Purification of human immunoglobulin G by thermoseparating aqueous two-phase systems*. Journal of Chromatography A, 2008. **1195**(1): p. 94-100.
 154. P. Rosa, A. Azevedo, I. Ferreira, J. De Vries, R. Korpmaal, H. Verhoef, T. Visser, and M. Aires-Barros, *Affinity partitioning of human antibodies in aqueous two-phase systems*. Journal of Chromatography A, 2007. **1162**(1): p. 103-113.
 155. A. Azevedo, P. Rosa, I. Ferreira, A. Pisco, J. De Vries, R. Korpmaal, T. Visser, and M. Aires-Barros, *Affinity-enhanced purification of human antibodies by aqueous two-phase extraction*. Separation and Purification Technology, 2009. **65**(1): p. 31-39.
 156. A.M. Azevedo, P.A. Rosa, I.F. Ferreira, J. de Vries, T. Visser, and M.R. Aires-Barros, *Downstream processing of human antibodies integrating an extraction capture step and cation exchange chromatography*. Journal of Chromatography B, 2009. **877**(1): p. 50-58.
 157. P. Rosa, A. Azevedo, I. Ferreira, S. Sommerfeld, W. Bäcker, and M. Aires-Barros, *Downstream processing of antibodies: Single-stage versus multi-stage aqueous two-phase extraction*. Journal of Chromatography A, 2009. **1216**(50): p. 8741-8749.
 158. L. Borlido, A.M. Azevedo, and M.R. Aires-Barros, *Extraction of human IgG in thermo-responsive aqueous two-phase systems: Assessment of structural stability by circular dichroism*. Separation Science and Technology, 2010. **45**(15): p. 2171-2179.
 159. V.L. Dhadge, S.A. Rosa, A. Azevedo, R. Aires-Barros, and A.C. Roque, *Magnetic aqueous two phase fishing: a hybrid process technology for antibody purification*. Journal of Chromatography A, 2014. **1339**: p. 59-64.
 160. P.A. Rosa, A.M. Azevedo, S. Sommerfeld, M. Mutter, W. Bäcker, and M.R. Aires-Barros, *Continuous purification of antibodies from cell culture supernatant with aqueous two-phase systems: From concept to process*. Biotechnology journal, 2013. **8**(3): p. 352-362.
 161. Food and D. Administration, *CFR-Code of Federal Regulations Title 21*. Part 860 - Medical Device Classification Procedures, 2015.
 162. D. Platis and N.E. Labrou, *Development of an aqueous two-phase partitioning system for fractionating therapeutic proteins from tobacco extract*. Journal of Chromatography A, 2006. **1128**(1): p. 114-124.
 163. D. Platis, J. Drossard, R. Fischer, J.-C. Ma, and N. Labrou, *New downstream processing strategy for the purification of monoclonal antibodies from transgenic tobacco plants*. Journal of Chromatography A, 2008. **1211**(1): p. 80-89.

164. D. Platis and N.E. Labrou, *Application of a PEG/salt aqueous two-phase partition system for the recovery of monoclonal antibodies from unclarified transgenic tobacco extract*. Biotechnology journal, 2009. **4**(9): p. 1320-1327.
165. H.-M. Park, S.-W. Lee, W.-J. Chang, and Y.-M. Koo, *Affinity separation by protein conjugated IgG in aqueous two-phase systems using horseradish peroxidase as a ligand carrier*. Journal of Chromatography B, 2007. **856**(1): p. 108-112.
166. M. Vargas, Á. Segura, M. Herrera, M. Villalta, Y. Angulo, J.M. Gutiérrez, G. León, and T. Burnouf, *Purification of IgG and albumin from human plasma by aqueous two phase system fractionation*. Biotechnology progress, 2012. **28**(4): p. 1005-1011.
167. M. Vargas, Á. Segura, M. Villalta, M. Herrera, J.M. Gutiérrez, and G. León, *Purification of equine whole IgG snake antivenom by using an aqueous two phase system as a primary purification step*. Biologicals, 2015. **43**(1): p. 37-46.
168. Q. Wu, D.-Q. Lin, and S.-J. Yao, *Evaluation of poly (ethylene glycol)/hydroxypropyl starch aqueous two-phase system for immunoglobulin G extraction*. Journal of Chromatography B, 2013. **928**: p. 106-112.
169. J. Mündges, J. Zierow, and T. Zeiner, *Experiment and simulation of an aqueous two-phase extraction process for the purification of a monoclonal antibody*. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, 2015. **95**: p. 31-42.
170. J. Muendges, I. Stark, S. Mohammad, A. Górak, and T. Zeiner, *Single stage aqueous two-phase extraction for monoclonal antibody purification from cell supernatant*. Fluid Phase Equilibria, 2015. **385**: p. 227-236.
171. P. Rosa, A. Azevedo, S. Sommerfeld, W. Bäcker, and M. Aires-Barros, *Aqueous two-phase extraction as a platform in the biomanufacturing industry: economical and environmental sustainability*. Biotechnology advances, 2011. **29**(6): p. 559-567.
172. J.F. Pereira, Á.S. Lima, M.G. Freire, and J.A. Coutinho, *Ionic liquids as adjuvants for the tailored extraction of biomolecules in aqueous biphasic systems*. Green Chemistry, 2010. **12**(9): p. 1661-1669.
173. K.E. Gutowski, G.A. Broker, H.D. Willauer, J.G. Huddleston, R.P. Swatloski, J.D. Holbrey, and R.D. Rogers, *Controlling the aqueous miscibility of ionic liquids: aqueous biphasic systems of water-miscible ionic liquids and water-structuring salts for recycle, metathesis, and separations*. Journal of the American Chemical Society, 2003. **125**(22): p. 6632-6633.
174. J. Dupont, R.F. de Souza, and P.A. Suarez, *Ionic liquid (molten salt) phase organometallic catalysis*. Chemical reviews, 2002. **102**(10): p. 3667-3692.
175. J.N. Canongia Lopes and A.A. Pádua, *Nanostructural organization in ionic liquids*. The Journal of Physical Chemistry B, 2006. **110**(7): p. 3330-3335.
176. M. Taha, M.R. Almeida, P. Domingues, S.P. Ventura, J.A. Coutinho, and M.G. Freire, *Novel biocompatible and self-buffering ionic liquids for biopharmaceutical applications*. Chemistry-A European Journal, 2015. **21**(12): p. 4781-4788.

177. M.G. Freire, C.M. Neves, I.M. Marrucho, J.N.C. Lopes, L.P.N. Rebelo, and J.A. Coutinho, *High-performance extraction of alkaloids using aqueous two-phase systems with ionic liquids*. Green Chemistry, 2010. **12**(10): p. 1715-1718.
178. S.P.M. Ventura, R.L.F. de Barros, J.M. de Pinho Barbosa, C.M.F. Soares, Á.S. Lima, and J.A.P. Coutinho, *Production and purification of an extracellular lipolytic enzyme using ionic liquid-based aqueous two-phase systems*. Green Chemistry, 2012. **14**(3): p. 734-740.
179. C. Wu, J. Peng, J. Li, Y. Bai, Y. Hu, and G. Lai, *Synthesis of poly (ethylene glycol)(PEG) functionalized ionic liquids and the application to hydrosilylation*. Catalysis Communications, 2008. **10**(2): p. 248-250.
180. Y. Jiang, H. Xia, J. Yu, C. Guo, and H. Liu, *Hydrophobic ionic liquids-assisted polymer recovery during penicillin extraction in aqueous two-phase system*. Chemical Engineering Journal, 2009. **147**(1): p. 22-26.
181. S. Hamzehzadeh and M. Vasires, *Ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium bromide as a promoter for the formation and extraction capability of poly (ethylene glycol)-potassium citrate aqueous biphasic system at T= 298.15 K*. Fluid Phase Equilibria, 2014. **382**: p. 80-88.
182. R.L. de Souza, V.C. Campos, S.P. Ventura, C.M. Soares, J.A. Coutinho, and Á.S. Lima, *Effect of ionic liquids as adjuvants on PEG-based ABS formation and the extraction of two probe dyes*. Fluid Phase Equilibria, 2014. **375**: p. 30-36.
183. S. Hamzehzadeh and M. Abbasi, *The influence of 1-butyl-3-methyl-imidazolium bromide on the partitioning of l-tyrosine within the {polyethylene glycol 600+ potassium citrate} aqueous biphasic system at T= 298.15 K*. The Journal of Chemical Thermodynamics, 2015. **80**: p. 102-111.
184. Y. Pei, J. Wang, K. Wu, X. Xuan, and X. Lu, *Ionic liquid-based aqueous two-phase extraction of selected proteins*. Separation and Purification Technology, 2009. **64**(3): p. 288-295.
185. J.C. Merchuk, B.A. Andrews, and J.A. Asenjo, *Aqueous two-phase systems for protein separation: Studies on phase inversion*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 1998. **711**(1-2): p. 285-293.
186. M.M. Bradford, *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical biochemistry, 1976. **72**(1-2): p. 248-254.
187. B. Geiger and K.M. Yamada, *Molecular architecture and function of matrix adhesions*. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2011. **3**(5): p. 1-21.
188. P.M. Comoglio, C. Boccaccio, and L. Trusolino, *Interactions between growth factor receptors and adhesion molecules: breaking the rules*. Current opinion in cell biology, 2003. **15**(5): p. 565-571.
189. R. Zaidel-Bar and B. Geiger, *The switchable integrin adhesome*. Journal of cell science, 2010. **123**(9): p. 1385-1388.
190. R.O. Hynes and A. Naba, *Overview of the matrisome — an inventory of extracellular matrix constituents and functions*. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2012. **4**(1): p. a004903.

191. M. Millard, S. Odde, and N. Neamati, *Integrin targeted therapeutics*. Theranostics, 2011. **1**(1): p. 154-188.
192. R. dos Santos, S.A. Rosa, M.R. Aires-Barros, A. Tover, and A.M. Azevedo, *Phenylboronic acid as a multi-modal ligand for the capture of monoclonal antibodies: Development and optimization of a washing step*. Journal of Chromatography A, 2014. **1355**: p. 115-124.
193. A.S. Tait, C.E. Hogwood, C.M. Smales, and D.G. Bracewell, *Host cell protein dynamics in the supernatant of a mAb producing CHO cell line*. Biotechnology and bioengineering, 2012. **109**(4): p. 971-982.
194. H.-O. Johansson, F.M. Magaldi, E. Feitosa, and A. Pessoa, *Protein partitioning in poly (ethylene glycol)/sodium polyacrylate aqueous two-phase systems*. Journal of chromatography A, 2008. **1178**(1): p. 145-153.
195. A.F.M. Cláudio, L. Swift, J.P. Hallett, T. Welton, J.A. Coutinho, and M.G. Freire, *Extended scale for the hydrogen-bond basicity of ionic liquids*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2014. **16**(14): p. 6593-6601.
196. A.F.M. Cláudio, A.M. Ferreira, S. Shahriari, M.G. Freire, and J.A. Coutinho, *Critical assessment of the formation of ionic-liquid-based aqueous two-phase systems in acidic media*. The Journal of Physical Chemistry B, 2011. **115**(38): p. 11145-11153.
197. G.D. Fasman, *Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules*. 2013: Springer Science & Business Media.
198. S.M. Kelly, T.J. Jess, and N.C. Price, *How to study proteins by circular dichroism*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics, 2005. **1751**(2): p. 119-139.
199. Y. Kohno, S. Saita, K. Murata, N. Nakamura, and H. Ohno, *Extraction of proteins with temperature sensitive and reversible phase change of ionic liquid/water mixture*. Polymer Chemistry, 2011. **2**(4): p. 862-867.
200. W. Wei and N.D. Danielson, *Fluorescence and circular dichroism spectroscopy of cytochrome c in alkylammonium formate ionic liquids*. Biomacromolecules, 2011. **12**(2): p. 290-297.
201. I. Jha and P. Venkatesu, *Endeavour to simplify the frustrated concept of protein-ammonium family ionic liquid interactions*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2015. **17**(32): p. 20466-20484.
202. M. Taha, M.V. Quental, I. Correia, M.G. Freire, and J.A. Coutinho, *Extraction and stability of bovine serum albumin (BSA) using cholinium-based Good's buffers ionic liquids*. Process Biochemistry, 2015. **50**(7): p. 1158-1166.
203. S. Dreyer and U. Kragl, *Ionic liquids for aqueous two-phase extraction and stabilization of enzymes*. Biotechnology and bioengineering, 2008. **99**(6): p. 1416-1424.
204. S.R. Martin and M.J. Schilstra, *Circular dichroism and its application to the study of biomolecules*. Methods in cell biology, 2008. **84**: p. 263-293.
205. S. Deep and J.C. Ahluwalia, *Interaction of bovine serum albumin with anionic surfactants*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2001. **3**(20): p. 4583-4591.

- 206. D. Ejima, K. Tsumoto, H. Fukada, R. Yumioka, K. Nagase, T. Arakawa, and J.S. Philo, *Effects of acid exposure on the conformation, stability, and aggregation of monoclonal antibodies*. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2007. **66**(4): p. 954-962.
- 207. N.I. Gerhardt and S.R. Dungan, *Changes in microemulsion and protein structure in IgG-AOT-brine-isooctane systems*. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2004. **108**(28): p. 9801-9810.
- 208. A.W. Vermeer and W. Norde, *The thermal stability of immunoglobulin: unfolding and aggregation of a multi-domain protein*. *Biophysical journal*, 2000. **78**(1): p. 394-404.

5. Anexos

Anexo A: Lista de anticorpos monoclonais terapêuticos.

Tabela A. 1 – Anticorpos monoclonais terapêuticos aprovados ou em revisão pela US Food and Drug Administration em Junho de 2015.

Denominação comum internacional	Nome comercial	Alvo	Formato	Indicação	Ano da primeira aprovação
Idarucizumab	Pendente	Dabigatran	Fab Humanizado	Reversão da anticoagulação induzida por dabigatran	Em revisão
Alirocumab	Praluent	PCSK9	IgG1 Humana	Colesterol elevado	Em revisão
Mepolizumab	Pendente	IL-5	IgG1 Humanizada	Asma eosinofílica severa	Em revisão
Necitumumab	Pendente	EGFR	IgG1 Humana	Cancro do pulmão de células não-pequenas	Em revisão
Evolocumab	Repatha	PCSK9	IgG2 Humana	Colesterol elevado	Em revisão
Dinutuximab	Unituxin	GD2	IgG1 quimérica	Neuroblastoma	2015
Secukinumab	Cosentyx	IL-17a	IgG1 Humana	Psoríase	2015
Nivolumab	Opdivo	PD1	IgG4 Humana	Melanoma	2014
Blinatumomab	Blincyto	CD19, CD3	Murine bispecific tandem scFv	Leucemia linfoblástica aguda	2014
Pembrolizumab	Keytruda	PD1	IgG4 Humanizada	Melanoma	2014
Ramucirumab	Cyramza	VEGFR2	IgG1 Humana	Cancro gástrico	2014
Vedolizumab	Entyvio	Integrina $\alpha 4\beta 7$	IgG1 Humanizada	Colite ulcerativa, doença de Crohn	2014
Siltuximab	Sylvant	IL-6	IgG1 quimérica	Doença de Castleman	2014
Obinutuzumab	Gazyva	CD20	IgG1 Humanizada	Leucemia linfocítica crónica	2013
Ado-trastuzumab emtansine	Kadcyla	HER2	IgG1 Humanizada	Cancro da mama	2013
Raxibacumab	Pendente	<i>B. anthracis</i> PA	IgG1 Humana	Infeção por Anthrax	2012
Pertuzumab	Perjeta	HER2	IgG1 Humanizada	Cancro da mama	2012
Brentuximab vedotin	Adcetris	CD30	IgG1 quimérica	Linfoma de Hodgkin, linfoma de grandes células anaplástico sistémico	2011

Belimumab	Benlysta	BLyS	IgG1 Humana	Lupus eritematoso sistémico	2011
Ipilimumab	Yervoy	CTLA-4	IgG1 Humana	Melanoma metastático	2011
Denosumab	Prolia	RANK-L	IgG2 Humana	Perda de massa óssea	2010
Tocilizumab	RoActemra, Actemra	IL-6R	IgG1 Humanizada	Artrite reumatoide	2010
Ofatumumab	Arzerra	CD20	IgG1 Humana	Leucemia linfocítica crónica	2009
Canakinumab	Ilaris	IL-1 β	IgG1 Humana	Síndrome de Muckle-Wells	2009
Golimumab	Simponi	TNF	IgG1 Humana	Artrite reumatoide e psoriática, espondilite anquilosante	2009
Ustekinumab	Stelara	IL-12/23	IgG1 Humana	Psoríase	2009
Certolizumab pegol	Cimzia	TNF	Fab Humanizada	Doença de Crohn	2008
Catumaxomab	Removab	EPCAM/CD3	mAb biespecífico de rato	Ascites malignas	NA
Eculizumab	Soliris	C5	IgG2/4 Humanizada	Hemoglobinúria paroximal noturna	2007
Ranibizumab	Lucentis	VEGF	Fab IgG1 Humanizada	Degeneração macular	2006
Panitumumab	Vectibix	EGFR	IgG2 Humana	Cancro colo-retal	2006
Natalizumab	Tysabri	Integrina α 4	IgG4 Humanizada	Esclerose múltipla	2004
Bevacizumab	Avastin	VEGF	IgG1 Humanizada	Cancro colo-retal	2004
Cetuximab	Erbix	EGFR	IgG1 quimérica	Cancro colo-retal	2004
Efalizumab	Raptiva	CD11a	IgG1 Humanizada	Psoríase	2003 #
Omalizumab	Xolair	IgE	IgG1 Humanizada	Asma	2003
Tositumomab-I131	Bexxar	CD20	IgG2a de rato	Linfoma Não-Hodgkin	2003 #
Ibritumomab tiuxetan	Zevalin	CD20	IgG1 de rato	Linfoma Não-Hodgkin	2002
Adalimumab	Humira	TNF	IgG1 Humana	Artrite reumatoide	2002
Alemtuzumab	MabCampath, Campath-1H; Lemtrada	CD52	IgG1 Humanizada	Leucemia mieloide crónica #; esclerose múltipla	2001 #; 2014
Gemtuzumab ozogamicin	Mylotarg	CD33	IgG4 Humanizada	Leucemia mieloide aguda	2000 #
Trastuzumab	Herceptin	HER2	IgG1 Humanizada	Cancro da mama	1998
Infliximab	Remicade	TNF	IgG1 quimérica	Doença de Crohn	1998
Palivizumab	Synagis	RSV	IgG1 Humanizada	Prevenção da infeção respiratória pelo vírus sincicial	1998

Basiliximab	Simulect	IL-2R	IgG1 quimérica	Prevenção da rejeição em transplantes de rim	1998
Daclizumab	Zenapax; Zinbryta	IL-2R	IgG1 Humanizada	Prevenção da rejeição em transplantes de rim #; esclerose múltipla	1997 #; em revisão
Rituximab	MabThera, Rituxan	CD20	IgG1 quimérica	Linfoma Não- Hodgkin	1997
Abciximab	Reopro	GPIIb/IIIa	Fab IgG1 quimérico	Prevenção de coágulos sanguíneos em angioplastia	1994
Muromonab- CD3	Orthoclone Okt3	CD3	IgG2a de rato	Reversão da rejeição em transplante de rim	1986 #

- Retirados ou com comercialização descontinuada pela primeira indicação aprovada;

NA – Não aprovado nos Estados Unidos mas aprovado na União Europeia.

Anexo B: Curva de calibração para quantificação de IgG por cromatografia de afinidade com Proteína G.

Para cada ensaio de quantificação de IgG por cromatografia de afinidade utilizando Proteína G, uma curva de calibração foi preparada utilizando IgG Gammanorm como proteína padrão, em concentrações a variar entre os 0,2 mg/L e os 20 mg/L. Apesar de ser preparada uma nova e fresca curva de calibração para a análise de cada conjunto de amostras, na Figura B.1 encontra-se representada um exemplo de uma curva de calibração tipicamente obtida para a quantificação de IgG. Esta representa a concentração de IgG, [IgG], expressa em mg/L em função da área do pico do cromatograma correspondente à IgG, expressa em mAU*min.

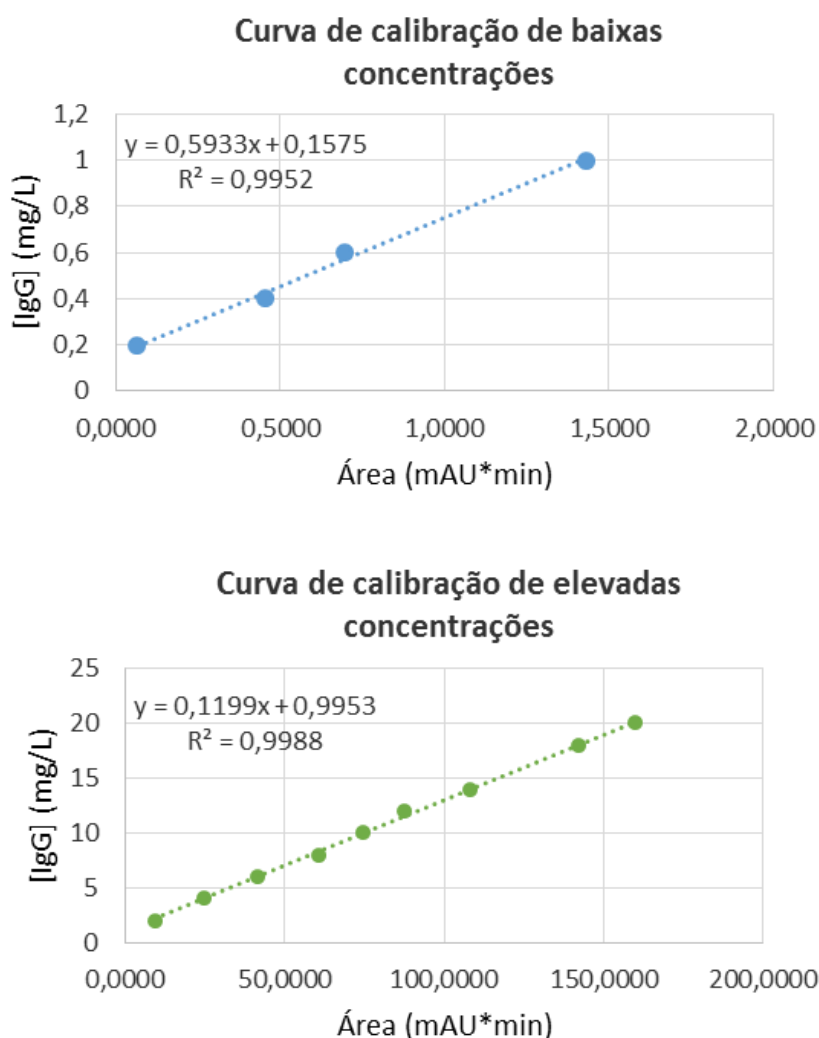


Figura B. 1 – Exemplo de uma curva de calibração tipicamente utilizada para a quantificação de IgG por cromatografia de afinidade com Proteína G, obtida através de soluções stock de IgG Gammanorm com concentrações compreendidas entre 0,2 mg/L e 20 mg/L.

Anexo C: Curva de calibração para quantificação de aniões Cl^- através de eletrodo seletivo de cloretos.

Para cada ensaio de quantificação de LIs por quantificação do anião Cl^- por eletrodo seletivo de cloretos, uma curva de calibração foi preparada utilizando KCl como padrão, em concentrações a variar entre os 0,1 mmol/L e os 100 mmol/L. Apesar de ser preparada uma nova e fresca curva de calibração para a análise de cada conjunto de amostras, na Figura C.1 encontra-se representada um exemplo de uma curva de calibração tipicamente obtida para a quantificação de cloretos. Esta representa a diferença de potencial, U , expressa em mV em função da concentração de Cl^- expressa em mmol/L.

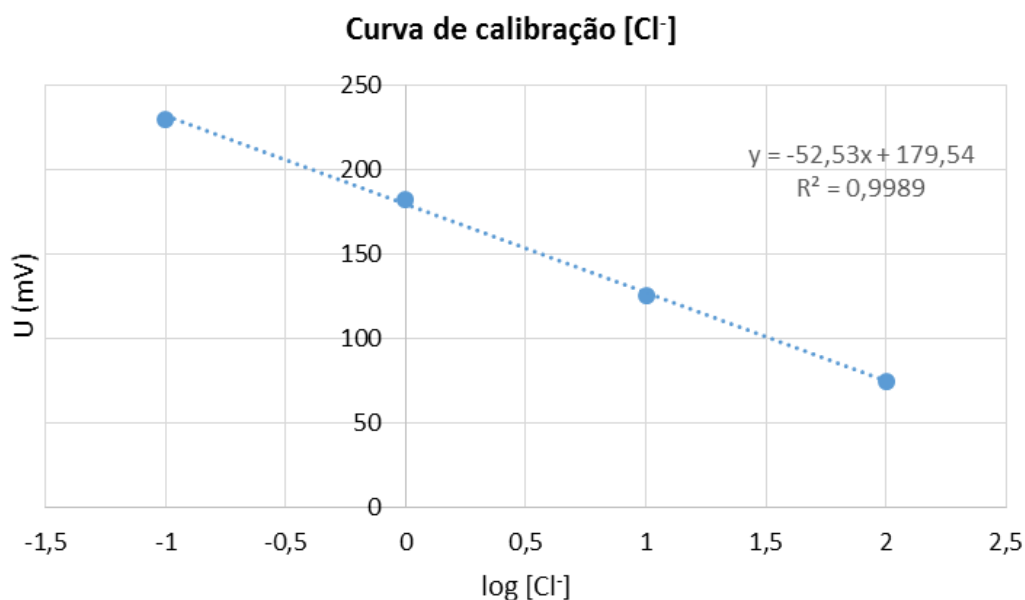


Figura C. 1 – Exemplo de uma curva de calibração tipicamente utilizada para a quantificação de LIs por quantificação do anião Cl^- através de eletrodo seletivo de cloretos, obtida através de uma solução stock de KCl com concentrações compreendidas entre 0,1 mmol/L e 100 mmol/L.

Anexo D: Curva de calibração para quantificação das proteínas totais pelo método de Bradford.

Para cada ensaio de quantificação das proteínas totais pelo método de Bradford, uma curva de calibração foi preparada utilizando BSA como padrão, em concentrações a variar entre os 5 mg/L e os 400 mg/L. Apesar de ser preparada uma nova e fresca curva de calibração para a análise de cada conjunto de amostras, na Figura D.1 encontra-se representada um exemplo de uma curva de calibração tipicamente obtida para a quantificação das proteínas totais. Esta representa a concentração da BSA, [BSA], expressa em mg/L, em função da absorvância a um comprimento de onda de 595 nm, expressa em unidades de absorvância (UA).

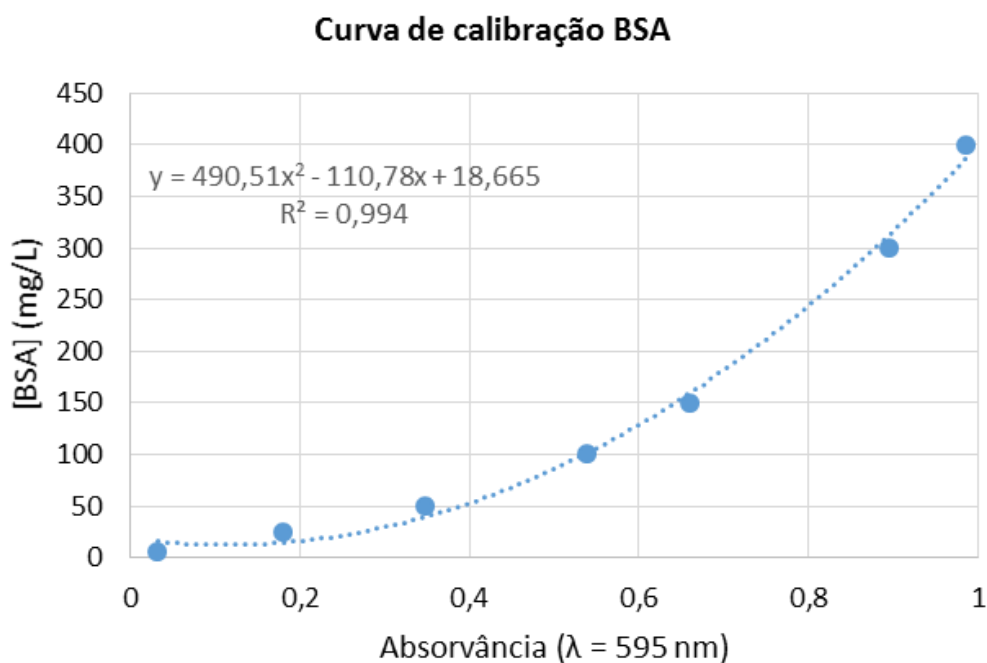


Figura D. 1 – Exemplo de uma curva de calibração tipicamente utilizada para a quantificação das proteínas totais pelo método de Bradford, obtida com a BSA como padrão e com concentrações compreendidas entre 5 mg/L e 400 mg/L.

Anexo E: Curvas binodais experimentais

As frações mássicas do diagrama de fases do sistema composto por PEG 3350 + dextrano 500 kDa + H₂O encontram-se listados na Tabela E.1.

Tabela E. 1 – Dados experimentais das frações mássicas para o sistema constituído por PEG 3350 (1) + dextrano 500 kDa (2) + H₂O (3) a 25 °C (± 1 °C), à pressão atmosférica e ao pH do sistema.

% (m/m) 1	% (m/m) 2	% (m/m) 3	% (m/m) 1	% (m/m) 2	% (m/m) 3
10,4745	0,6808	88,8447	6,7963	4,2348	88,9689
8,1115	1,1045	90,7840	6,7822	3,9927	89,2251
7,6084	2,0643	90,3273	6,7419	4,1040	89,1541
7,5826	1,7642	90,6532	6,7374	4,2484	89,0142
7,5289	1,8281	90,6430	6,6656	4,3785	88,9559
7,5231	1,8902	90,5867	6,5830	4,5339	88,8831
7,5202	1,9598	90,5200	6,5203	4,6941	88,7856
7,4584	2,0149	90,5268	6,4852	4,8920	88,6228
7,4578	2,0573	90,4849	6,4258	5,0801	88,4941
7,4555	2,1252	90,4192	6,3457	5,3002	88,3540
7,4309	2,2016	90,3675	6,2741	5,5169	88,2091
7,3985	2,2544	90,3471	6,2245	5,7488	88,0267
7,3520	2,3280	90,3200	6,1157	6,1475	87,7368
7,3269	2,3820	90,2911	6,0849	5,9921	87,9230
7,3025	2,4502	90,2474	5,9954	6,3136	87,6910
7,3006	2,5178	90,1816	5,9580	6,7165	87,3255
7,2155	2,5768	90,2078	5,8089	7,0436	87,1475
7,2154	2,6301	90,1545	5,6593	7,3540	86,9867
7,2056	2,6881	90,1064	5,6407	7,4335	86,9257
7,1763	2,7321	90,0916	5,4872	7,8060	86,7068
7,1715	2,7945	90,0341	5,4729	7,8502	86,6769
7,1493	2,8503	90,0003	5,3684	8,2916	86,3400
7,1415	2,9035	89,9550	5,3102	8,2704	86,4194
7,1153	2,9603	89,9244	5,1787	8,8333	85,9879
7,1128	3,0218	89,8653	5,0977	8,8574	86,0449
7,1066	3,1087	89,7847	4,9985	9,5192	85,4823
7,0740	3,1823	89,7437	4,8936	9,4456	85,6609
7,0279	3,2507	89,7215	4,8065	10,2910	84,9025
6,9946	3,3267	89,6787	4,5479	10,4751	84,9770
6,9747	3,4216	89,6036	4,5081	11,0908	84,4011
6,9403	3,5007	89,5591	4,1995	12,1620	83,6386
6,8840	3,5788	89,5371	3,8950	13,7756	82,3294
6,8802	3,6861	89,4336	3,5827	16,0277	80,3897
6,8700	3,7946	89,3354	3,0366	18,6363	78,3271
6,8266	3,8870	89,2865			